

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**CARACTERIZAÇÃO DOS MICRORGANISMOS E QUANTIFICAÇÃO  
DE TOXINAS BACTERIANAS NO MÚSCULO DE PEIXES  
PELÁGICOS UTILIZADOS NO CONSUMO HUMANO NA ILHA DA  
MADEIRA**

Olga Geraldine De Ascensão Vieira

MESTRADO DE MICROBIOLOGIA APLICADA

**2010**

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**CARACTERIZAÇÃO DOS MICRORGANISMOS E QUANTIFICAÇÃO  
DE TOXINAS BACTERIANAS NO MÚSCULO DE PEIXES  
PELÁGICOS UTILIZADOS NO CONSUMO HUMANO NA ILHA DA  
MADEIRA**

Olga Geraldine De Ascensão Vieira

Dissertação orientada pela Prof. Doutora Graça Costa (Universidade da  
Madeira) e Prof. Doutora Manuela Carolino (Faculdade de Ciências –  
Universidade de Lisboa)

MESTRADO DE MICROBIOLOGIA APLICADA

2010

## RESUMO

O presente estudo teve como objectivo a caracterização microbiológica e toxicológica do músculo de duas espécies pelágicas, *Scomber colias* (cavala) e *Trachurus picturatus* (chicharro), ao longo do tempo de armazenamento a 4 °C, a fim de determinar as mudanças de qualidade e o tempo de vida útil do pescado. Foram realizadas análises sensoriais, bioquímicas (pH e detecção da verotoxina 1 e 2, e da enterotoxina estafilocócica) e microbiológicas (Contagens de Microrganismos Mesofílicos, de *Pseudomonas* spp., de Bactérias Entéricas e de *Enterococcus* sp.). Os resultados sensoriais indicam que o tempo de vida útil da cavala e do chicharro, de acordo com o esquema da Comunidade Europeia é 10 e 7 dias, respectivamente. As contagens microbianas ao longo do tempo de armazenamento têm tendência a aumentar, permitindo concluir que o limite de aceitabilidade para consumo, de acordo com as normas para os alimentos prontos a comer, para ambas as espécies é de 3 dias. O aumento das contagens das espécies de *Pseudomonas* ao longo do tempo de armazenamento, não foi significativo em ambas as espécies, embora façam parte da microbiota degradativa dos peixes. Os valores de pH tendencialmente aumentam ao longo do tempo de armazenamento, porém a fresco (0 dias), ambas as espécies possuíam pH ácido, provavelmente devido a reacções autolíticas. A verotoxina 1 e 2, foi detectada numa única amostra de cavala, enquanto que a enterotoxina (A, B, C, D, E), produzida pelo *Staphylococcus aureus*, foi detectada em todas as amostras analisadas, indicativo de falhas nos procedimentos higiosanitários de manipulação, comercialização, transporte e/ou armazenamento deste pescado.

**Palavras – chave:** *Scomber colias*; *Trachurus picturatus*; Qualidade Microbiológica; Qualidade Sensorial; detecção de Toxinas

## ABSTRACT

This study aimed to characterize microbiologically and toxicologically the muscle of two pelagic species, *Scomber Colias* (mackerel) and *Trachurus picturatus* (horse mackerel), over time of storage at 4 ° C in order to determine changes in quality and time useful life of the fish. Were performed sensory analysis, biochemical (pH and detection of verotoxin 1 and 2, and staphylococcal enterotoxin) and microbiological (counts mesophilic microorganisms, *Pseudomonas* spp. Enteric Bacteria and *Enterococcus* sp.). The results indicate that the sensory shelf life of mackerel and horse mackerel, according to the scheme of the European Community is 10 and 7 days respectively. The count over time of storage, are likely to increase, allowing to conclude that the limit of acceptability for consumption, according to the standards for ready to eat foods, for both species is 3 days. The increase in counts of *Pseudomonas* species during the storage time was not significant in both species, although being part of degradative microflora of fish. The pH values tended to increase over time of storage, but the fresh (0 days), both species had a low pH, probably due to autolytic reactions. A verotoxin 1 and 2 was detected in one sample of mackerel, while enterotoxina (A, B, C, D, E), produced by *Staphylococcus aureus*, was detected in all samples, indicative of flaws in the procedures of higiosanitários handling, marketing, transport or storage of fish.

**Key words:** *Scomber colias*, *Trachurus picturatus*, Microbiological quality, Sensorial quality, Toxin detection

## ÍNDICE

Resumo .....	i
Abstract.....	ii
Índice .....	1
Índice de Tabelas, Gráficos e figuras .....	3
Agradecimentos.....	5
Revisão Bibliográfica .....	6
1.    Introdução .....	6
2.    Caracterização da Microbiota frequentemente encontrada nos peixes marinhos .....	7
2.1.    Microrganismos indicadores .....	8
2.1.1.    Microrganismos mesofílicos.....	8
2.1.2. <i>Pseudomonas</i> spp. ....	8
2.1.3. <i>Enterococcus</i> sp. ....	9
2.1.4.    Bactérias entéricas .....	9
2.1.4.1. <i>Escherichia coli</i> .....	10
2.2.    Factores que influenciam a Microbiota do alimento .....	10
2.2.1.    Factores Intrínsecos .....	10
2.2.1.1.    pH.....	11
2.2.2.    Factores Extrínsecos .....	11
2.2.2.1.    Temperatura.....	11
2.3.    Análise sensorial do peixe .....	12
2.4.    Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo (HACCP).....	12
2.5.    Critérios Microbiológicos aplicáveis aos alimentos.....	13
3.    Toxinas bacterianas .....	13
3.1.    Verotoxina.....	13
3.2.    Enterotoxina Estafilocócica.....	14
3.3.    Métodos de detecção das toxinas bacterianas.....	14
3.3.1.    O Ensaio Imunoenzimático (ELISA) .....	15
Objectivos .....	15
Material e Métodos .....	16
1.    Preparação e análise das amostras .....	16
1.1.    Peixes amostrados .....	16
1.2.    Colheita das Amostras.....	16
1.3.    Preparação das Amostras .....	16
1.4.    Análise Sensorial .....	17
1.5.    Análise Microbiológica e Bioquímica da qualidade do pescado.....	17
1.5.1.    Contagem de Microrganismos aeróbios a 30 °C.....	17
1.5.2.    Contagem de Bactérias entéricas em placa .....	18
1.5.3.    Contagem e Pesquisa de <i>Pseudomonas</i> spp.....	18
1.5.4.    Contagem de <i>Enterococcus</i> sp.....	18
1.5.5.    Identificação de colónias bacterianas entéricas .....	19
1.5.6.    Detecção e Quantificação da Verotoxina 1 e 2 .....	19

1.5.7.	Detecção e Quantificação da enterotoxina Estafilococica.....	20
1.6.	Análise estatística .....	20
	Resultados e Discussão .....	21
1.	Análise Microbiológica .....	21
2.	pH.....	27
3.	Análise Sensorial .....	31
4.	Análise da Verotoxina 1 e 2 e da Enterotoxina Estafilococica .....	33
	Conclusão.....	39
	Anexos.....	40
	Bibliografia .....	42

## ÍNDICE DE TABELAS, GRÁFICOS E FIGURAS

- ☞ **Tabela 1** – Normas da Organização Mundial para a Saúde para a qualidade microbiológica de vários alimentos prontos a comer.
- ☞ **Tabela 2** – Categorias dos tipos de alimentos marinhos prontos a comer.
- ☞ **Tabela 3** - Quantidade de Enterotoxina (A, B, C, D, E) do *Staphylococcus aureus*, obtido nas amostras de Cavala e Chicharro analisadas ao longo do tempo de refrigeração a 4 °C.
- ☞ **Tabela 4** – Testes bioquímicos presentes na galeria de identificação API 20E.
- ☞ **Fig. 1** – Imagem do kit de detecção da Verotoxina 1 e 2, RIDASCREEN® Verotoxin .
- ☞ **Fig. 2** – Imagem do kit de detecção da enterotoxina estafilocócica RIDASCREEN® SET A,B,C,D,E.
- ☞ **Fig. 3** – Quantificação dos microrganismos presentes no músculo de cavala (*Scomber colias*) ao longo do tempo de armazenamento a 4 °C. **(a)** Microrganismos aeróbios, **(b)** *Pseudomonas* spp., **(c)** Enterobactérias, **(d)** *Enterococcus* sp.
- ☞ **Fig. 4** – Quantificação dos microrganismos presentes no músculo de chicharro (*Trachurus picturatus*) ao longo do tempo de armazenamento a 4 °C. **(a)** Microrganismos aeróbios, **(b)** *Pseudomonas* spp., **(c)** Enterobactérias, **(d)** *Enterococcus* sp.
- ☞ **Fig. 5** – Variação dos microrganismos analisados ao longo do tempo de armazenamento a 4 °C, **(a)** Cavala e **(b)** Chicharro.
- ☞ **Fig. 6** – Variação dos valores médio de pH ao longo do tempo de armazenamento a 4 °C, **(a)** Cavala, **(b)** Chicharro.
- ☞ **Fig. 7** - Quantificação dos microrganismos e variação de pH no músculo de cavala (*Scomber colias*) ao longo do tempo de armazenamento. **(a)** *Enterococcus* sp., **(b)** Microrganismo mesofílicos, **(c)** Enterobactérias e **(d)** *Pseudomonas* sp.
- ☞ **Fig. 8** - Qualidade sensorial e valores de pH do músculo de peixe ao longo do tempo de armazenamento. **(a)** Cavala, **(b)** Chicharro.
- ☞ **Fig. 9** - Quantificação dos microrganismos e variação de pH no músculo de chicharro (*Trachurus picturatus*) ao longo do tempo de armazenamento. **(a)** *Enterococcus* sp., **(b)** Microrganismo mesofílicos, **(c)** Enterobactérias e **(d)** *Pseudomonas* sp.
- ☞ **Fig. 10** - Gradiente de Frescura **(a)** Cavala e **(b)** Chicharro, em quatro categorias (Excelente (E), Elevada Qualidade (A), Boa Qualidade (B), Impróprio para venda (C)), de acordo com a Comunidade Europeia.
- ☞ **Fig. 11** - Imagem representativa do resultado positivo obtido na detecção da Verotoxina 1 e 2 da cavala, através do kit de detecção RIDASCREEN® Verotoxin.
- ☞ **Fig. 12** - Quantidade de verotoxina 1 e 2 detectada no músculo de cavala, *Scomber colias*, em função de **(a)** pH, **(b)** Qualidade Sensorial, **(c)** log (CFU/g) *Enterobacteriaceae*.
- ☞ **Fig. 13** - Quantidade de enterotoxina estafilocócica A,B,C,D e E detectada na cavala em função do **(a)** Tempo de Refrigeração, **(b)** pH, **(c)** log (CFU/g) *Enterococcus* sp., e **(d)** Qualidade Sensorial.

☞ **Fig. 14** - Quantidade de enterotoxina estafilocócica A,B,C,D e E detectada no chicharro em função do (a) Tempo de Refrigeração, (b) pH, (c) log (CFU/g) *Enterococcus* sp., e (d) Qualidade Sensorial.

☞ **Fig. 15** - Imagem representativa do resultado positivo obtido na detecção da Enterotoxina (A, B, C, D, E) do *Staphylococcus aureus*, através do kit de detecção RIDASCREEN® SET A,B,C,D,E.



## AGRADECIMENTOS

"Determinação, coragem e autoconfiança são factores decisivos para o sucesso. Se estivermos possuídos por uma inabalável determinação conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho."

Dalai Lama

Este pensamento reflecte a minha personalidade e a forma como pretendo atingir este objectivo de realização pessoal, mantendo sempre a humildade e a gratidão perante todas as pessoas que me acompanharam nesta longa caminhada. Neste momento especial quero expressar o meu reconhecido agradecimento:

Ao Prof. Dr. Rogério Tenreiro, Coordenador do Mestrado de Microbiologia Aplicada, que desde os primórdios da minha candidatura foi sempre muito prestável, cordial e solidário, ajudando-me e orientando-me em todos os procedimentos necessários para a legalização do projecto.

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Graça Costa, pela orientação e apoio prestado desde a minha aceitação para desenvolvimento do estudo e durante todo o seu desenvolvimento. Agradeço também pela bibliografia disponibilizada, leitura e correcção do trabalho.

Ao Prof. Dr. Miguel Ângelo Carvalho, cujo apoio e orientação numa das partes do estudo foi crucial, sendo sempre muito prestável e interessado.

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Manuela Carolino, pela sua disponibilidade e atenção apesar do estudo ter sido desenvolvido fora do ambiente académico da Faculdade de Ciências.

A todo o pessoal do Centro de Estudos da Macaronesia (Universidade da Madeira) e da Estação de Biologia Marinha do Funchal, em especial ao Renato Barradas, pela paciência, amizade e aconselhamento técnico laboratorial.

A toda minha família (pais, irmãos, avó) porque sem cada um de vós a minha existência seria neutral e indistinguível, sendo os principais responsáveis por todas as minhas conquistas atingidas até hoje e por todo o apoio, carinho, força e incentivo que prestaram nos momentos de maior dificuldade.

Ao meu marido, que com o seu apoio e ânimo, permitiu que este projecto fosse levado até o final, depositando em mim toda a sua confiança, incentivo e força.

A todos quanto colaboraram e contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e que hoje em dia tanto "me deixam", muitíssimo obrigado!!!

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. Introdução

A nível da União Europeia (UE), é obrigatório por lei que toda a entidade processadora ou manipuladora de alimentos identifique os riscos em todas as fases da sua actividade, assegurando a segurança alimentar e garantindo que todos os procedimentos de segurança adequados são implementados, mantidos e revistos (Commission. 1993). Independentemente do género alimentar, quase toda a legislação nacional e internacional está direccionada numa perspectiva de avaliar e gerir os riscos dos alimentos.

A análise dos riscos no processo de produção e manuseamento dos alimentos, deve identificar e caracterizar os perigos no processo, assim como a exposição e caracterização dos riscos (Mitchell 2000). O HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points – Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo), é um sistema de identificação e prevenção de potenciais problemas de segurança alimentar, no processamento, distribuição e uso dos alimentos (Baker 1995). As medidas preventivas adoptadas por este sistema são a implementação de Pontos Críticos de Controlo (CCP), onde um potencial perigo associado ao alimento, a localização ambiental (armazenamento), ao procedimento manual ou ao procedimento mecânico, podem ser controlados (Baker 1995).

Os alimentos são heterogéneos, pelo que a deterioração dos mesmos são consequência do crescimento e/ou actividade microbiana, sendo estas alterações notadas a nível das características sensoriais (Gram and Huss 1996).

Os alimentos crus são inicialmente contaminados por uma variedade de microrganismos, mas só uma parte destes consegue colonizar o alimento e crescer em elevado número (Gram and Huss 1996). No caso dos peixes aplica-se o mesmo princípio, em que uma fracção da microbiota é responsável pelo processo de deterioração, sendo dependente de factores intrínsecos ou extrínsecos (Koutsoumanis *et al.* 2002), nomeadamente a temperatura, pH, actividade da água ( $A_w$ ), potencial redox (Eh), interacções microbianas, entre outros (Gram and Huss 1996). Alterações mínimas que possam ocorrer no processamento ou empacotamento dos produtos de pescaria, são causadores de alterações drásticas no desenvolvimento e composição da microbiota decompositora, provocando assim diferentes tipos de degradação dos alimentos (Gram and Huss 1996).

As bactérias degradativas, responsáveis pela degradação dos produtos de pescaria e do peixe fresco (quando armazenados sob condições de aerobiose e temperatura de refrigeração, aproximadamente 4 °C), são na sua maioria organismos psicrófilos (temperatura de crescimento varia entre os 0 e os 20 °C, sendo a temperatura óptima de crescimento 15 °C) (Ferreira Canas *et al.* 2010) Gram-negativo, nomeadamente, *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Shewanella* e *Flavobacterium* spp. (Hubbs 1991).

Quando um sistema aquático está contaminado com bactérias patogénicas, estas bactérias posteriormente podem fazer parte da microbiota do alimento de origem aquático. Se associado a esta contaminação prévia, houver um inapropriado processo de empacotamento, carregamento e preservação do produto então as bactérias patogénicas proliferam perigosamente com uma taxa exponencial, causando ameaças de infecções e intoxicações alimentares devido ao consumo destes alimentos contaminados (Colakoglu *et al.* 2006).

Para além deste facto, a falta de formação dos operadores, os procedimentos inadequados de colheita e de processamento, podem resultar em contaminação cruzada com bactérias patogénicas causadoras de doenças ((ICMSF) 1998).

A qualidade do peixe fresco é a principal preocupação da indústria e dos consumidores (Chytiri *et al.* 2004). Peixes como a cavala e o chicharro (*Scomber colias* e *Trachurus picturatus*, respectivamente), são de grande importância económica no Arquipélago da Madeira, no que toca ao seu consumo frequente pela população local e pela comunidade turística. Assim sendo, torna-se necessário garantir a qualidade e a segurança das suas características microbiológicas, bioquímicas e organolépticas, em conformidade com as normas para a qualidade microbiológica dos alimentos prontos a comer (Gilbert *et al.* 2000), os padrões bacteriológicos de alimentos portugueses (Ribeiro 1974) e os regulamentos e decretos estabelecidos pela legislação portuguesa e comunitária (regulamento (CE) N° 1441/2007 da Comissão de 5 de Dezembro de 2007, Decreto-Lei 223/2008 de 18 de Novembro, Portaria n.º 559/76 de 7 de Setembro).

*Scomber colias* (Gmelin, 1789) presente na Ilha da Madeira, é uma espécie pelágica, que pertence a família *Scombridae* e Encontra-se, principalmente distribuída nas zonas costeiras do oceano Atlântico (Collette 1999).

No que toca ao *Trachurus picturatus*, é igualmente uma espécie pelágica da família *Carangidae*, a qual se encontra em profundidades variáveis, normalmente até aos 370m. Está frequentemente confinada a zonas neríticas das ilhas, sendo uma espécie muito abundante entre o sul da Baía de Biscaia e Mauritânia, incluindo Madeira, Açores, Canárias e a parte oeste do Mediterrâneo (Benguria and Camiña 1975; Bauchot and Pras 1980; Smith-Vaniz and Berry 1981; Smith-Vaniz 1986).

## **2. Caracterização da Microbiota frequentemente encontrada nos peixes marinhos**

Os peixes e os crustáceos podem ser capturados das fontes naturais e de zonas de aquacultura. Na sua generalidade, são ricos em proteínas e compostos azotados não proteicos; sendo os seus conteúdos de gordura variáveis consoante o tipo de peixe e a sua sazonalidade (Ray and Bhunia 2008). A população microbiana nestes produtos varia muito com o nível de poluição e temperatura da água. De uma forma geral, os músculos dos peixes e mariscos são estéreis, no entanto as escamas, as guelras e os intestinos abrigam microrganismos, entre os quais bactérias pertencentes a diversos grupos taxonómicos, vírus, parasitas e protozoários, podendo estar presentes no material cru (Ray and Bhunia 2008), por meio de contaminação cruzada ou do grau de deterioração do próprio alimento.

Devido ao facto dos produtos de pescarias, nomeadamente o peixe fresco, ser um alimento básico de consumo frequente, torna-se necessário saber qual a microbiota presente no mesmo. No caso dos produtos alimentares colhidos em ambientes marinhos, encontram-se microrganismos halofílicos do género *Vibrio*, bem como, coliformes, microrganismos dos géneros *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Flavobacterium*, *Enterococcus*, *Micrococcus* e agentes patogénicos como *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* e o *Clostridium botulinum* tipo E, *Aeromonas hydrophila* (patogénico oportunista) e *Plesiomonas shigelloides* (patogénico oportunista) (Ray and Bhunia 2008). No caso dos produtos serem colhidos em águas poluídas, os microrganismos podem crescer

rapidamente nos peixes e os crustáceos, porque a Aw e o pH elevados do tecido, disponibilizam grandes quantidades de compostos azotados não proteicos (Ray and Bhunia 2008).

Muitas das espécies bacterianas referidas são psicrófilos, pelo que podem crescer a qualquer temperatura de refrigeração e os agentes patogénicos podem permanecer viáveis por um longo período de armazenamento (Ray and Bhunia 2008).

## **2.1. Microrganismos indicadores**

Os microrganismos indicadores são espécies ou grupo de microrganismos que indicam a possível presença de patógenos, cuja presença em níveis elevados, reflectem pontos de segurança inadequados durante o tratamento do alimento (Mossel *et al.* 1995). De uma forma geral, estes microrganismos são frequentemente utilizados para avaliar a sanidade dos produtos alimentares (Jay 1992). Embora não haja especificações sobre quais os microrganismo(s) indicador(es) mais útil, actualmente sabe-se que algumas destas bactérias são encontradas no tracto digestivo e fezes dos animais e dos seres humanos. Bactérias como os coliformes totais, coliformes fecais, *Enterococos* e mais recentemente *Escherichia coli* (*E. coli*), foram estabelecidos como indicadores preferenciais (Noble *et al.* 2003).

### **2.1.1. Microrganismos mesofílicos**

A contagem de colónias aeróbias representa o número total de bactérias encontradas nos alimentos (Neighborhood Services.). Esta contagem engloba microrganismos, cuja temperatura ideal de crescimento varia entre os 25 e 40 °C (Ray and Bhunia 2008). Em produtos frescos, a contagem destes microrganismos indica a efectividade dos procedimentos sanitários usados, durante o seu processamento, manuseamento e armazenamento (Ray and Bhunia 2008). Para além, dos factores anteriormente descritos, contagens elevadas destes microrganismos podem estar associados a longos processos de refrigeração ou à não refrigeração dos mesmos (Neighborhood Services.). Este tipo de análise é efectuado na maioria dos alimentos, a excepção daqueles que possuem níveis elevados da carga microbiana devido ao processo tecnológico a que são submetidos, nomeadamente as carnes fermentadas (exemplo os salames) e os produtos lácteos (Neighborhood Services.).

### **2.1.2. *Pseudomonas* spp.**

Espécies do género *Pseudomonas* são microrganismos aeróbios, com metabolismo oxidativo, não fermentativo e catalase positiva. Estes bacilos Gram negativo móveis possuem um flagelo polar, sendo capazes de degradar proteínas, lípidos e hidratos de carbono, devido a variedade de enzimas extracelulares (proteolíticas, lipídicas e sacarolíticas, respectivamente) que produzem. Estes microrganismos podem ser encontrados nos alimentos, no solo e na água, podendo ser utilizados como um parâmetro indicador de higiene (Roberts and Greenwood 2003).

O género *Pseudomonas* é constituído por microrganismos psicrófilos (Ferreira Canas *et al.* 2010) responsáveis por perdas económicas significativas (Braun and Sutherland 2003), pelo facto de serem bactérias importantes na degradação do peixe ou produtos de pesca, armazenados em aeróbiose sob condições de refrigeração (Hubbs 1991; Gram and Huss 1996; Koutsoumanis and Nychas 1999). Espécies de *Pseudomonas* juntamente com microrganismos da espécie *Shewanella putrefaciens* fazem parte da microbiota degradativa específica de peixes de águas temperadas e

tropicais (Gillespie 1981; Lima dos Santos 1981; Gram and Huss 1996). Geralmente a deterioração da qualidade do peixe fresco é detectável através da perda de sabor (sabor doce) (Gram and Huss 1996). Odores e sabores frutados, sulfidrilícos e de podridão são característicos de espécies de *Pseudomonas* presentes nos peixes armazenados em gelo, dado que estes microrganismos produzem aldeídos voláteis, cetonas, ésteres e sulfuretos (Miller III *et al.* 1973; Edwards *et al.* 1987).

### **2.1.3. *Enterococcus* sp.**

O género *Enterococcus* foi criado recentemente, dado que muitas das espécies actualmente incluídas nele, estavam agrupadas no grupo dos *Streptococos* fecais (Hackney *et al.* 1979b; Matches and Abeyta 1983; Schleifer and Kilpper-Balz 1987; Hartman *et al.* 1992; Ray and Bhunia 2008).

As espécies de *Enterococcus* são microrganismos Gram-positivo, não móveis e não formadores de esporos (Foulquié Moreno *et al.* 2006; Ray and Bhunia 2008), com a forma de coco ou cocobacilo, sendo catalase negativa e apresentando um metabolismo respiratório anaeróbio facultativo (Foulquié Moreno *et al.* 2006; Ray and Bhunia 2008). Tendo em conta a sua fisiologia, as espécies de *Enterococcus* apresentam uma temperatura óptima de crescimento a volta dos 35 °C, no entanto algumas destas espécies podem crescer entre os 10 °C e os 45 °C (Sherman 1937; Domig *et al.* 2003; Foulquié Moreno *et al.* 2006; Ray and Bhunia 2008). Geralmente, são mais resistentes que os coliformes, dado que, conseguem resistir às temperaturas de refrigeração ( $\leq 4$  °C), temperaturas de congelamento, secagem, baixo pH, concentrações de cloreto de sódio (NaCl) a 6.5% e até 30 minutos a uma temperatura de 60 °C (Sherman 1937; Domig *et al.* 2003; Foulquié Moreno *et al.* 2006; Ray and Bhunia 2008).

No que toca ao seu habitat, o género *Enterococcus* está amplamente distribuído, podendo ser encontrado no solo, na superfície das plantas (Deibel and Silliker 1963; Mundt 1986; Domig *et al.* 2003; Foulquié Moreno *et al.* 2006; Ray and Bhunia 2008), da água, dos vegetais, dos insectos, no tracto gastrointestinal dos humanos e animais (Foulquié Moreno *et al.* 2006; Ray and Bhunia 2008), nos produtos lácteos e noutros alimentos (Domig *et al.* 2003). Devido a sua resistência nas mais diversas condições e a capacidade de dominar a população microbiana presente em alimentos tratados termicamente, estes microrganismos podem ser usados como indicadores de contaminação fecal (Stiles and Holzapfel 1997; Domig *et al.* 2003; Ray and Bhunia 2008). Contagens elevadas destes indicadores nas matérias-primas cruas, indicam higiene inadequada do equipamento, no processamento e tratamento dos alimentos (Ray and Bhunia 2008).

A constante evolução das tecnologias de processamento e armazenamento do peixe, pode proporcionar o aparecimento de outras bactérias Gram-positivo resistentes (Gram and Huss 1996; Al Bulushi *et al.* 2010). Embora presentes em número relativamente baixo, quando comparados com os outros grupos bacterianos responsáveis pela deterioração, as bactérias Gram positivo podem interagir com estes grupos e influenciar os padrões de deterioração do peixe (Al Bulushi *et al.* 2010).

### **2.1.4. Bactérias entéricas**

A família *Enterobacteriaceae* é constituída por bacilos Gram-negativo, com metabolismo fermentativo anaeróbio facultativo (Willey *et al.* 2008). Podem ser encontrados em diversos locais, fazendo parte da microbiota gastrointestinal dos humanos e animais, assim como, encontrar-se no solo, nas plantas e na água (Ray and Bhunia 2008). Muitas das espécies mesofílicas desta família,

nomeadamente *Salmonella* spp., *Shigella* spp, e algumas estirpes de *E. coli*, que estão difundidas no ambiente, podem contaminar os alimentos com baixas contagens (Molin and Stenström 1984; Ternström and Lindberg 1987; Garcia-Armesto *et al.* 1993; Lindberg *et al.* 1998b) e podem causar diarreias severas, por outro lado, os *taxa* psicrófilos podem multiplicar-se em alimentos refrigerados como a carne, o peixe e o leite (Lindberg *et al.* 1998b).

Esta família não só inclui os coliformes, como também muitos géneros e espécies patogénicas entéricas, pelo que, segundo a bibliografia consultada, a enumeração de todo o grupo pode ser o melhor indicador do nível de sanidade, de uma possível contaminação fecal e/ou da possível presença de patógenos entéricos nos alimentos (Ray and Bhunia 2008).

#### **2.1.4.1. *Escherichia coli***

A espécie *E. coli* é um bacilo Gram negativo, não esporulado, anaeróbio facultativo, habitante do tracto intestinal dos humanos, dos animais de sangue quente e pássaros, presente em elevado número (Ray and Bhunia 2008). Por este facto, é usado como organismo indicador de contaminação fecal e da possível presença de patógenos entéricos nos alimentos e na água (Ray and Bhunia 2008). As infecções causadas pelas estirpes patogénicas de *E. coli* podem ser transmitidas essencialmente, através de três vias, o contacto directo com os animais, o contacto com os humanos, e/ou o consumo de alimentos contaminados (Pelczar *et al.* 1997).

Algumas estirpes de *E. coli*, conseguem crescer em ambientes com temperaturas entre 7 e 46°C e têm uma temperatura óptima de crescimento entre 35 e 40°C (temperatura na qual a taxa específica de crescimento é máxima). As estirpes patogénicas sobrevivem, geralmente, às temperaturas de refrigeração, apesar de ocorrer uma ligeira redução após uma a cinco semanas de armazenamento (Varman and Evans 1996).

As estirpes patogénicas de *E. coli* são subdivididas de acordo com a sua capacidade para produzir toxinas em seis grupos, *E. coli* Enterotoxinogénica (ETEC), *E. coli* Enteropatogénica (EPEC), *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* Enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* de adesão difusível (DAEC) (Kornacki and Marth 1982; Doyle and Padhye 1989; Doyle 1991; Nataro and Kaper 1998; Aceson 1999; Donnenberg and Whittan 2001; Ray and Bhunia 2008).

## **2.2. Factores que influenciam a Microbiota do alimento**

Normalmente, os alimentos possuem uma população mista de microrganismos, incluindo diferentes espécies e estirpes de bactérias, fungos e leveduras, podendo algumas delas estar presentes em níveis mais elevados do que outras (Ray and Bhunia 2008).

Os microrganismos (excepto os vírus), crescem e/ou multiplicam-se nos alimentos, de acordo com as condições dos mesmos (factores intrínsecos), bem como, sob as condições de armazenamento dos alimentos (factores extrínsecos). A influência de cada factor sobre o crescimento microbiano, não pode ser estudado de forma independente, pois todos eles estão interligados e influenciam a vários níveis (Ray and Bhunia 2008).

### **2.2.1. Factores Intrínsecos**

São vários os factores intrínsecos nos alimentos que afectam o crescimento microbiano, entre os quais podemos destacar, os nutrientes disponíveis, os factores de crescimento e/ou inibidores (ou

antimicrobianos), o  $A_w$ , o pH, e o Eh. Tal como referido anteriormente, estes factores têm uma acção combinada no crescimento microbiano (Ray and Bhunia 2008). Destacamos, o pH, por ter sido o factor intrínseco estudado.

#### **2.2.1.1. pH**

O pH, indica a concentração do ião hidrogénio num sistema, sendo um valor muito variável consoante o tipo de alimento (Ray and Bhunia 2008). De acordo com esta medida, os alimentos podem ser classificados em, (1) alimentos ricos em ácidos, cujo valor de pH é  $< 4,6$  e (2) alimentos de baixa acidez, cujo valor de pH é  $\geq 4,6$  (Ray and Bhunia 2008).

A maioria das frutas e dos sumos de frutas, os alimentos fermentados e as saladas, apresentam valores de pH baixos (i.e. são ricos em ácido) e estão incluídos no primeiro grupo, enquanto que a maioria dos legumes, a carne, o peixe, o leite e as sopas, possuem baixa acidez, pelo que estão incluídas no segundo grupo (Ray and Bhunia 2008). Para os alimentos ricos em ácido, existe um limite mínimo de acidez, que normalmente encontra-se acima dos 3,0 (excepto para algumas frutas cítricas), no caso dos alimentos de baixa acidez, existe um limite máximo, que normalmente não excede os 7,0 (excepto os moluscos, pH 7,1 e o albúmen, pH 8,5) (Ray and Bhunia 2008).

O efeito do pH sobre o crescimento e viabilidade das células microbianas é bastante acentuado, na medida que para cada espécie existe um valor de pH ideal dentro de uma gama de valores que favorecem o crescimento (Ray and Bhunia 2008). Numa forma generalizada, os fungos (pH 1,5 – 9,0) e as leveduras (pH 2,0 – 8,5) comparativamente com as bactérias têm a capacidade de crescer sob valores de pH mais baixos e são mais tolerantes a variações de pH. No entanto, as bactérias Gram-negativas (pH 4,5 – 9,0) são mais sensíveis a pH baixos do que as bactérias Gram positivas (pH 4,0 – 8,5) (Ray and Bhunia 2008).

#### **2.2.2. Factores Extrínsecos**

Os factores extrínsecos, tais como os intrínsecos são muito importantes para medir o crescimento microbiano nos alimentos, dado que estes incluem as condições ambientais às quais os alimentos são submetidos, nomeadamente a temperatura, a humidade relativa e o ambiente gasoso. Tanto a humidade relativa do ar, como a atmosfera modificada de armazenamento, são factores que podem influenciar respectivamente a  $A_w$  e o Eh dos alimentos (Ray and Bhunia 2008). Destacamos a temperatura, por ter sido o factor extrínseco estudado.

##### **2.2.2.1. Temperatura**

As reacções enzimáticas promovem o crescimento microbiano e estas reacções são variáveis de acordo com a temperatura, na medida que por cada aumento de 10 °C na temperatura, a taxa catalítica das reacções enzimáticas duplica, e por cada diminuição de 10 °C a taxa catalítica é reduzida a metade, sendo esta variabilidade um factor muito importante no crescimento microbiano nos alimentos (Ray and Bhunia 2008).

Segundo a temperatura de crescimento, os microrganismos são classificados em (1) Termófilos (crescimento a elevadas temperaturas), conseguem crescer entre os 45 e 70 °C, sendo a sua temperatura ideal de crescimento os 55 °C; (2) Mesófilos (crescimento a temperatura ambiente),

podem crescer entre os 10 e 45 °C, sendo a sua temperatura ideal de crescimento 35 °C; e (3) Psicrófilos (crescimento a baixas temperaturas), podem crescer numa gama de temperaturas que vai desde os 0 °C até 20 °C, sendo a sua temperatura ideal de crescimento os 15 °C (Ray and Bhunia 2008; Ferreira Canas *et al.* 2010).

Dois dos grupos anteriormente referidos (psicrófilos e termófilos), são muito importantes na microbiologia alimentar, pelo facto de poder haver crescimento microbiano no armazenamento dos alimentos em temperaturas de refrigeração e após processamento dos mesmos (permitindo por exemplo a sobrevivência de microrganismos esporulados durante pasteurização) (Ray and Bhunia 2008).

### **2.3. Análise sensorial do peixe**

A qualidade dos peixes é avaliada, através do seu grau de frescura. Assim sendo, alterações microbiológicas, bioquímicas e sensoriais, são factores associados a deterioração da qualidade do peixe durante a manipulação e armazenamento (Ehira and Uchiyama 1986; Chytiri *et al.* 2004).

Embora uma variedade de parâmetros bioquímicos, físicos (Gill 1992; 1997; Chytiri *et al.* 2004) e microbiológicos (Gram and Huss 1996; Chytiri *et al.* 2004), sejam usados para avaliar o grau de frescura dos peixes, a avaliação sensorial é ainda o método mais satisfatório neste tipo de análise (Connell 1975; Reineccius 1990; Chytiri *et al.* 2004).

Segundo a European Community (EC), a análise sensorial do peixe cru, resulta na classificação de cada amostra de acordo com a aparência da pele, textura do corpo, dos olhos, das guelras e órgãos internos, da viscosidade a superfície e do odor. As amostras são incluídas numa determinada categoria Excelente qualidade (E), Elevada qualidade (A), Boa qualidade (B), e Não apto para venda (C), (Chytiri *et al.* 2004).

### **2.4. Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo (HACCP)**

O sistema HACCP, é cada vez mais aceite no controlo alimentar, pelo facto de ser uma ferramenta de gestão de segurança que não só melhora a eficácia das operações e a qualidade dos produtos, como também é um requisito de satisfação dos clientes e dos consumidores. Assim o HACCP pode ser incorporada em programas de gestão da qualidade total (TQM), (Vanne *et al.* 1996). Esta ferramenta possui dois componentes essenciais, (1) análise ou identificação dos riscos associadas com a produção e transformação de um determinado tipo de alimento, i.e., que microrganismo(s) patogénico(s) que espera-se possam estar presentes num determinado alimento, e (2) identificar os pontos críticos de controlo (PCC), i.e., as medidas de controlo adequadas que devem ser implementadas nos locais de processamento dos alimentos, a fim de evitar qualquer risco para os consumidores (Ray and Bhunia 2008).

Na produção alimentar, o maior risco presente é o de contaminação microbiológica, pelo que o HACCP, é a medida adoptada internacionalmente para garantir a segurança (Campbell-Platt 1994). Um dos conceitos básicos associados a este sistema é que, quando devidamente concebido, implementado, monitorizado, verificado e analisado, permite garantir a qualidade microbiológica do produto final (Jouve 1994).



## 2.5. Critérios Microbiológicos aplicáveis aos alimentos.

A criação e aplicação de critérios microbiológicos para os alimentos é da responsabilidade de entidades internacionais, nomeadamente, a Organização Mundial da Saúde (OMS), a Comissão Internacional sobre as Especificações Microbiológicas dos Alimentos (ICMSF) e a Comissão dos Codex Alimentarius (Roberts and Greenwood 2003). Estes critérios tem como objectivo, proteger a saúde do consumidor, fornecendo produtos seguros, saudáveis e que satisfazem os requisitos de boas práticas de comércio, garantindo que os organismos indesejados são eliminados (Roberts and Greenwood 2003).

Os critérios microbiológicos podem ser classificados em:

- Padrões microbiológicos; critérios obrigatórios, incluídos na legislação ou regulamentação e cujo não cumprimento pode resultar num processo judicial (Roberts and Greenwood 2003).
- Especificações microbiológicas; no geral são acordos contratuais entre o fabricante e o comprador, de modo a verificar que os alimentos têm a qualidade exigida (Roberts and Greenwood 2003).
- Directrizes microbiológicas; são critérios não-obrigatórios, geralmente destinam-se a orientar os fabricantes e ajudar a garantir boas práticas de higiene (Roberts and Greenwood 2003).

Recentemente a Organização Mundial para Saúde publicou valores de referência (**Tabela 1 e 2**, em anexo) para a interpretação de resultados obtidos a partir de uma análise microbiológica de vários alimentos, nomeadamente, carnes (porcina, bovina e aviária), alimentos marinhos (peixe, crustáceos, moluscos, etc), vegetais, alimentos fermentados, alimentos processados prontos a comer, etc (Roberts and Greenwood 2003).

## 3. Toxinas bacterianas

As doenças infecciosas transmitidas pelos alimentos e causadas por microrganismos produtores de toxinas podem ser classificadas em (1) Intoxicações, as quais são causadas pelo consumo de alimentos que contêm produtos químicos ou toxinas produzidas por microrganismos, e em (2) Toxinfecções, sendo consequência de enterotoxinas bacterianas produzidas durante a colonização e crescimento das bactérias no tracto intestinal do hospedeiro (Vanne *et al.* 1996).

Os microrganismos patogénicos produtores de toxinas podem crescer nos alimentos e nos ingredientes alimentares, sendo responsáveis por intoxicações alimentares no homem. As toxinas podem ser proteínas ou pequenas moléculas com estabilidade térmica, que produzem sintomatologia variada conforme o agente patogénico envolvido (Ray and Bhunia 2008). A aplicação de medidas sanitárias adequadas, durante o processamento e tratamento posterior do alimento, assim como a sua conservação, permitem reduzir a incidência das intoxicações (Ray and Bhunia 2008).

### 3.1. Verotoxina.

A espécie *E. coli*, é constituída por diversos serótipos entre os quais podemos encontrar o serótipo O157-H7. Um patógeno de origem alimentar, responsável pela Colitis Hemorrágica (Riley *et al.* 1983; Gamage *et al.* 2003) e pelo Síndrome Urémico Hemolítico (HUS) (Karmali *et al.* 1983; Gamage *et al.* 2003). O serótipo *E. coli* O157-H7, é produtor de dois tipos de citotoxinas, a verotoxina 1 e a verotoxina 2 (RIDASECREEN® Verotoxin). Devido a semelhança das verotoxinas com a

shigatoxina produzida pela *Shigella dysentery*, estas têm sido também designadas como toxina shiga-like 1 e 2 (SLT-1 e SLT – 2), (RIDASECREEN® Verotoxin).

Muitas das estirpes de *E. coli* verotoxinogénica (VTEC) são reconhecidas como patógenos humanos, pelo que são uma preocupação a nível da segurança alimentar (Rivas, L. *et al*, 2010) e um risco para saúde pública ((EFSA) 2007).

Esta estirpe patogénica, está geralmente presente no intestino dos animais sem produzir sintomatologia, no entanto, também têm sido isolada de fezes de galinhas, cabras, ovelhas, porcos, cães, gatos, etc, provocando muitas infecções e surtos epidémicos nos Estados Unidos, Europa e Canada (Strachan *et al.* 2006; Erickson and Doyle 2007; Franz and van Bruggen 2008; Ray and Bhunia 2008; Rivas *et al.* 2010).

O principal objectivo da indústria alimentar é o controlo do crescimento e a contagem da estirpe VTEC (Rivas *et al.* 2010), sendo necessário adoptar medidas sanitárias na manipulação e processamento dos alimentos, assim como o tempo de cozedura e temperaturas de refrigeração adequadas (Ray and Bhunia 2008).

### **3.2. Enterotoxina Estafilocócica.**

A intoxicação alimentar estafilocócica, é uma das causas mais prevalentes de gastroenteritis no mundo, sendo provocada pelo consumo de toxinas pré-formadas nos alimentos (Jablonski and Bohach 2001). A espécie *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) é produtora de um elevado número de toxinas (A, B, C, D e E) que invadem as células e tecidos do hospedeiro, possuindo a habilidade de escapar ao sistema imunitário (Zell *et al.* 2008). Estudos mostram que algumas estirpes estafilocócicas, nomeadamente do *S. aureus*, são causadores das intoxicações alimentares (Marin *et al.* 1992; Janssen *et al.* 1997; Evenson *et al.* 1998; Jablonski and Bohach 2001). As espécies estafilocócicas são facilmente destruídos por meio de tratamentos térmicos, no entanto, as suas enterotoxinas termoestáveis, permanecem activas nos alimentos, resultando um problema de saúde pública (Carmo *et al.* 2002) e um risco elevado para a saúde dos consumidores (Simon and Sanjeev 2007).

Os alimentos marinhos, como os enlatados, fumados, salgados, congelados, pasta de peixe cozido e linguiça de peixe, são ricos em proteínas, permitindo o crescimento do *S. aureus* que inibem o crescimento de microrganismos competidores (Bryan 1980; Sanjeev *et al.* 1986; Nakano *et al.* 2004; Simon and Sanjeev 2007).

Uma das vias mais frequentes de transmissão dos microrganismos para os alimentos é através do manipulador (Sousa *et al.* 1998). O homem é portador comum do *S. aureus* no nariz, na garganta e em infecções cutâneas, podendo facilmente ser transmitidos para os alimentos durante a manipulação (Pereira *et al.* 1994). Esta contaminação pode ser resultante de uma combinação de manuseamento não sanitário dos alimentos, armazenamento impróprio e contaminação cruzada (Synder and Poland 1991; Ng and Tay 1993; Huang *et al.* 2001; Simon and Sanjeev 2007).

### **3.3. Métodos de detecção das toxinas bacterianas.**

Microrganismos tais como o *S. aureus*, *E. coli*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, são capazes de crescer nos alimentos e produzir toxinas, causando assim intoxicações e envenenamento alimentar entre os consumidores (Richardson 1985; Administration

1992; Vanderzant and Splittstoesser 1992; Bhunia 2006; Ray and Bhunia 2008). Por este motivo foram desenvolvidos diversos métodos específicos, nomeadamente, o radioimunoensaio (RIA), ensaio imunoenzimático (ELISA), o teste de aglutinação passiva reversa em latex (RPLA) e o método de precipitação MICROSLIDE (Bhunia 2006). Destacamos o Ensaio Imunoenzimático (ELISA), por ter sido o método de detecção das toxinas utilizado.

### **3.3.1. O Ensaio Imunoenzimático (ELISA)**

O Imunoensaio ELISA é um método analítico comumente usado na detecção de espécies patogénicas ou suas toxinas (Ray and Bhunia 2008). A ligação do antígeno (espécie(s) patogénica(s) ou toxinas) ao anticorpo primário é altamente específica e medida quantitativamente por espectrofotometria numa microplaca de 96 poços (Ray and Bhunia 2008).

Existem três tipos de ensaios de ELISA, (1) indirectos, (2) em “sandwich” e (3) de competição por inibição (Ray and Bhunia 2008). Utilizou-se o ensaio em “sandwich”, o qual consiste na imobilização previa do anticorpo primário na placa, de modo a que este consiga ligar-se com afinidade e especificidade ao antígeno, posteriormente é adicionado o anticorpo secundário marcado com uma enzima e que vai ligar-se ao antígeno e ao anticorpo primário, formando uma configuração típica de sandwich (Ray and Bhunia 2008).

A principal desvantagem deste método é que, todos os passos da análise requerem rigorosos passos de lavagem os quais são muito trabalhosos e difíceis de automatizar (Vanne *et al.* 1996).

## **OBJECTIVOS**

O presente estudo teve como objectivo a caracterização microbiológica e toxicológica do músculo de duas espécies pelágicas, *Scomber colias* (cavala) e *Trachurus picturatus* (chicharro), ao longo do tempo de armazenamento a 4 °C, a fim de determinar as mudanças de qualidade e o tempo de vida útil do pescado.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **1. Preparação e análise das amostras**

#### **1.1. Peixes amostrados**

Durante o estudo foram analisadas um total de 60 amostras do músculo dos peixes, adquiridas no Mercado dos Lavradores – Funchal. Do conjunto dos peixes amostrados, mensalmente foram analisados 6 amostras do músculo do peixe da espécie *Scomber colias* e 6 amostras do músculo do peixe da espécie *Trachurus picturatus*. As amostras foram transportadas para o Laboratório da Estação de Biologia Marinha do Funchal e para o Laboratório do Centro de Estudos da Macaronésia – Universidade da Madeira, em condições de assepsia e cavas de frio. Seguidamente, as amostras foram armazenadas em condições de refrigeração (aproximadamente 4 °C), no interior dos sacos de amostragem e analisadas ao longo de 14 dias em espaços de tempo estipulados (2 dias, 4 a 5 dias, 6 a 7 dias, 8 a 9 dias, 10 a 11 dias e 14 a 15 dias). As amostras de peixes com 0 dias de armazenamento, foram analisadas no laboratório logo após terem sido adquiridas no mercado, não tendo sido submetidas a armazenamento a 4 °C.

Os espaços temporais de armazenamento a 4 °C analisados para cada conjunto de 6 amostras pertencente a cada espécie, permite concluir sobre o tempo de vida útil do peixe, assim como sobre a qualidade do músculo dos mesmos, através de análises sensoriais, microbiológicas, medições de pH e detecção e quantificação dos dois tipos de toxinas bacterianas (Verotoxina 1 e 2 e a enterotoxina *Enterococcus* A, B, C, D, E, F e G) nas mesmas amostras.

#### **1.2. Colheita das Amostras**

Após a chegada das amostras ao laboratório, estas foram armazenadas no frigorífico a uma temperatura aproximada de 4 °C, excepto para as amostras com 0 dias de armazenamento. A análise de cada amostra foi antecedida pela desinfecção externa e interna dos sacos de origem. Este procedimento consistiu na sanificação dos sacos de plástico com um algodão embebido em álcool 70%, sendo este procedimento feito perto da chama do bico de Bunsen. Posteriormente, com ajuda de uma pinça, bisturi e tesouras previamente esterilizadas, pesou-se 10 g, 5 g e 2 g de músculo separadamente de ambas espécies de peixes amostradas e colocou-se em frascos estéreis com tampa previamente rotulados.

#### **1.3. Preparação das Amostras**

De cada uma das amostras de peixe, de ambas espécies analisadas, foram retirados 10 g de músculo destinado a análise microbiológica, 5 g de músculo para a medição do pH muscular e 2 g de músculo para a detecção das toxinas bacterianas analisadas.

A análise microbiológica do músculo de cada um dos peixes amostrados, consistiu na preparação de uma suspensão inicial  $10^{-1}$ . Este procedimento consistiu na adição de 90 mL de Água Peptonada Tamponada (Biogerm Laboratórios), a cada 10 g de músculo de peixe amostrado. Posteriormente foram realizadas diluições seriadas (até a diluição  $10^{-3}$ ), utilizando o mesmo tampão, a partir da suspensão inicial.

A medição do pH muscular de cada peixe amostrado, consistiu primariamente na preparação de uma suspensão. Este procedimento efectuou-se através da adição de 45 mL de água destilada, a cada 5 g de músculo de peixe amostrado. Posteriormente, esta suspensão foi agitada e o pH foi medido através de fitas medidoras de pH (Merk Laboratórios).

Para a detecção e quantificação dos dois tipos de toxinas analisadas, retirou-se 2 g de músculo de cada peixe amostrado (1 g foi utilizada para a detecção e quantificação da verotoxina 1 e 2, e 1 g para a detecção e quantificação da enterotoxina estafilocócica).

Para a detecção e quantificação da verotoxina 1 e 2, foi necessário fazer um pré-enriquecimento prévio nas amostras através da preparação de uma suspensão inicial. Este procedimento consistiu na adição de 9 mL do caldo “modified Tryptic-Soy-Broth” (mTSB – Biokar Diagnostic) suplementado com Novobiocina a 1g de músculo de cada peixe amostrado, seguido de uma incubação de 6 horas a 37 °C em agitação constante. Posteriormente, adicionou-se 1 mL da suspensão inicial a 4 mL do caldo mTSB (Biokar Diagnostic) suplementado com Mitomicina C. Este procedimento foi seguido de uma incubação de 18 horas a 37 °C em agitação constante. Finalmente, após a incubação, centrifugou-se a suspensão obtida durante 10 minutos a uma velocidade de 3500 g e a temperatura ambiente. Posteriormente foi usado 100 µL do sobrenadante em cada ensaio (RIDASCREEN® Verotoxin).

No caso da enterotoxina estafilocócica, a preparação das amostras consistiu na adição de 1,5 mL de tampão PBS (Phosphate buffered saline) a 1 g de músculo de cada peixe amostrado. Centrifugou-se a suspensão durante 10 minutos a uma velocidade de 3500 g e a uma temperatura de 15 °C. Seguidamente fez-se uma filtração do sobrenadante resultante e usou-se 100 µL do filtrado por cada ensaio (RIDASCREEN® SET A,B,C,D,E).

#### **1.4. Análise Sensorial**

A análise sensorial de cada peixe analisado foi realizada antes da abertura do mesmo e resultou na apreciação da aparência da pele, da textura do corpo, da cor dos olhos, da cor das guelras e dos órgãos internos, da viscosidade a superfície e do odor. Esta caracterização permite classificar cada amostra em, Excelente qualidade (E), o peixe apresenta características perfeitas; Elevada qualidade (A), ligeira perda das características excelentes; Boa qualidade (B), presença de alguma deterioração mas apto para venda; e Não apto para venda (C) (esquema gradativo proposto pela Comunidade Europeia e citado por Chytiri, S. *et al*, 2004).

#### **1.5. Análise Microbiológica e Bioquímica da qualidade do pescado**

##### **1.5.1. Contagem de Microrganismos aeróbios a 30 °C**

Na contagem dos microrganismos aeróbios mesofílicos, foi utilizada a gelose nutritiva Marine Agar (MA) (Difco). Este meio de cultura apresenta um conjunto de nutrientes (fontes de proteínas, de vitaminas e hidratos de carbono) que favorecem o crescimento da maior parte das bactérias presentes em ambientes marinhos. Este método consiste em semear 1 mL das diluições consideradas convenientes (neste caso da suspensão inicial,  $10^{-1}$  até diluição  $10^{-3}$ ) por incorporação, em meio Marine Agar. As placas inoculadas foram incubadas a 30 °C durante 72 horas.

### 1.5.2. Contagem de Bactérias entéricas em placa

Na contagem das bactérias entéricas foi utilizado o meio de cultura Violet Red Bile Glucose Agar (bioMérieux™). Este meio de cultura é composto por sais biliares e cristal violeta que inibem as bactérias Gram positivas, e por glucose e vermelho neutro, que permite a detecção da fermentação deste nutriente pelos microrganismos.

Para a contagem em placa das bactérias entéricas, foi seguida a norma ISO 21528-2 (2004), que preconiza a utilização do meio VRBG, semeado por incorporação de 1 mL de inóculo em camada dupla, incubando a 30 °C por 24 horas. Nestes ensaios foram semeados inóculos correspondentes às diluições  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ .

### 1.5.3. Contagem e Pesquisa de *Pseudomonas* spp.

Na contagem das espécies bacterianas pertencentes ao género *Pseudomonas* foi utilizado o meio de cultura (preparado e distribuído em placas) *Pseudomonas* CN agar (Biogerm Laboratórios). Este meio é composto por peptona gelatina (16 g / L); hidrolisato caseína (10 g / L); sulfato de potássio (10 g / L); cloreto de magnésio (1,4 g / L); agar (11 g / L); cetramida (200 mg / L); nalidixato de sódio (15 g / L). A peptona e a caseína, aportam os nutrientes necessários para o crescimento bacteriano, nomeadamente azoto, vitaminas, minerais e aminoácidos. A cetramida é adicionada como agente selectivo e o nalidixato suprime o crescimento de contaminantes de meios com cetramida, nomeadamente, *Klebsiella* sp., *Proteus* sp. e *Providencia* sp. O sulfato de potássio e o cloreto de magnésio, aportam catiões para activar a produção da Píocianina. O agar serve de base para solidificação do meio.

Para a contagem em placa das bactérias pertencentes ao género *Pseudomonas*, foi seguida a norma ISO 13720 (1995), que preconiza a utilização do meio *Pseudomonas* Agar Base suplementado com cetramida, fucidina e cefalosporina (CFC). Este meio permite o isolamento de espécies pertencentes ao género *Pseudomonas* de uma forma generalizada, no entanto o suplemento presente no meio utilizado foi a cetramida e o nalidixato de sódio (CN), o qual permite um melhor isolamento da espécie bacteriana *Pseudomona aeruginosa*. O meio foi semeado por espalhamento com 0,1 mL de inóculo, incubado a 25 °C por 48 horas. Nestes ensaios foram semeados inóculos correspondentes as diluições  $10^{-1}$  até  $10^{-3}$ . Seguidamente foi feita uma repicagem de 5 colónias características, incubadas a 25 °C, durante 24 horas, e testadas bioquimicamente, através do teste da Oxidase (coloração azul/roxo, Oxidase positivo) e meio de Kligler (crescimento a superfície, microrganismos aeróbio estrito).

### 1.5.4. Contagem de *Enterococcus* sp.

Na contagem das bactérias do género *Enterococcus* foi utilizado o meio Slanetz & Bartley (OXOID). Este meio é composto por triptose e extractos de levedura, os quais fornecem os nutrientes essenciais para o crescimento microbiano, tais como, o azoto, as vitaminas, os minerais e os aminoácidos; glicose, como fonte de carbono para o processo fermentativo; o fosfato de dipotássio; azida de sódio, que é o agente selectivo; o cloreto de tetrazolio, é indicador redox, que permite saber se as células encontram-se metabolicamente activas; e agar bacteriológico.

O meio Slanetz & Bartley, semeado por espalhamento com 0,1 mL de inóculo, incubado a 36 °C por 48 horas. Nestes ensaios foram semeados inóculos correspondentes as diluições  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ .

#### 1.5.5. Identificação de colónias bacterianas entéricas

Para a identificação das colónias bacterianas entéricas, seleccionaram-se colónias de coloração rosa/avermelhada (obtidas a partir da contagem em placa, ponto 1.5.2) que foram inoculadas separadamente em Água Peptonada Tamponada (Biogerm Laboratórios). Este caldo de enriquecimento permite a recuperação metabólica das colónias, o qual é essencial para a viabilidade e fiabilidade dos testes bioquímicos.

Após o enriquecimento, foram realizados os testes bioquímicos da coloração de Gram, da Catalase e da Oxidase. A coloração de Gram, permite a diferenciação das bactérias Gram negativas das bactérias Gram Positivas. O teste da Catalase, permite identificar bactérias catalase positivas. O teste da Oxidase, permite detectar a presença do citocromo C oxidase como aceitador final de electrões. Seguidamente cada cultura foi inoculado numa galeria Api 20E (bioMérieuxTM), constituída por 20 testes bioquímicos (**Tabela 4**, em anexo), na tentativa de uma possível identificação presuntiva do isolado.

#### 1.5.6. Detecção e Quantificação da Verotoxina 1 e 2

Para a detecção e quantificação da toxina produzida pela bactéria *Escherichia coli* (O157-H7) seguiu-se a metodologia do kit imunoenzimático RIDASCREEN® Verotoxin (r-biopharm) que preconiza uma preparação prévia das amostras em dois caldos de enriquecimento (ver ponto 1.3.). Após a preparação das amostras, procedeu-se a detecção e quantificação da Verotoxina 1 e 2, inoculando 100 µL de amostra no imunoensaio enzimático RIDASCREEN® Verotoxin (r-biopharm). Este imunoensaio tem por base uma reacção antígeno-anticorpo. No caso da presença da Verotoxina é formado um complexo entre o anticorpo imóvel, a Verotoxina e o anticorpo-enzima conjugada. As medições são feitas espectro-fotometricamente com um comprimento de onda de 450 nm, sendo o valor obtido directamente proporcional a concentração da Verotoxina na amostra (RIDASCREEN® Verotoxin).



**Fig. 1** – Imagem representativa do kit de detecção da Verotoxina 1 e 2, RIDASCREEN® Verotoxin .

### 1.5.7. Detecção e Quantificação da enterotoxina Estafilocócica

Para a detecção e quantificação da enterotoxina produzida pelo *Staphylococcus aureus* seguiu-se a metodologia do kit imunoenzimático RIDASCREEN® SET A,B,C,D,E (r-biopharm). Foi necessário uma preparação prévia da amostra em tampão PBS (pH 7,4), permitindo a suspensão das enterotoxinas (ver ponto 1.3.). Após a preparação das amostras, procedeu-se a detecção e quantificação da enterotoxina Estafilocócica, utilizando o imunoensaio enzimático RIDASCREEN® SET A,B,C,D,E (r-biopharm). Este imunoensaio têm por base uma reacção antigénio-anticorpo. As células A - E e a célula H (controlo positivo) do imunoensaio, estão revestidas com anticorpos específicos contra as Enterotoxinas A,B,C,D,E do *Staphylococcus*. As células F e G, servem de controlo negativo e estão revestidos com anticorpos de animais não imunizados (RIDASCREEN® SET A,B,C,D,E).

As toxinas presentes ligam-se especificamente aos anticorpos conjugados com peroxidases; assim sendo, todos os componentes das amostras que não estejam ligados aos anticorpos ou a qualquer enzima conjugada, são removidos nos passos de lavagem. O substrato da enzima e o cromogénio, são adicionados e incubados. A ligação do conjugado da enzima transforma as cores do cromogénio num produto azul, sendo que após a adição da solução STOP, ocorre uma mudança de cor para amarelo. A medição é feita espectrofotometricamente nos 450 nm, sendo o valor da absorvância obtida proporcional a concentração da enterotoxina na amostra (RIDASCREEN® SET A,B,C,D,E).



**Fig. 2** – Imagem representativa do kit de detecção da enterotoxina estafilocócica RIDASCREEN® SET A,B,C,D,E.

### 1.6. Análise estatística

Os dados foram informatizados e analisados estatisticamente pelo software SPSS 17.0 para Windows. A comparação entre as amostras e a sua significância estatística ao longo do tempo de armazenamento foi determinada através de matrizes de correlação (coeficiente de correlação de Spearman) entre os resultados obtidos nas medições de pH, nas análises sensoriais, nas análises microbiológicas e na quantificação e detecção da verotoxina 1 e 2 e da enterotoxina estafilocócica. Este tipo de análise foi feita para validar estatisticamente as alterações ocorridas no peixe ao longo do tempo de armazenamento, assim como estimar um tempo de vida útil para cada uma das espécies de peixe analisado.



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. Análise Microbiológica

As mudanças na microbiota das espécies *Scomber colias* (cavala) e *Trachurus picturatus* (chicharro), ao longo do tempo de refrigeração são visualizadas nas **Fig. (3a-d) e (4a-d)**, respectivamente.

Na cavala, as contagens iniciais (0 dias) dos microrganismos aeróbios mesofílicos, aportam um valor médio de  $6,25 \times 10^2$  (CFU / g), atingindo o valor máximo ao fim de 9 dias de armazenamento ( $2,35 \times 10^5$  CFU / g), **Fig. 3a e 5a**. Embora, ao longo do tempo de refrigeração as contagens mesofílicas halófilas na cavala apresentem um aumento não linear, é possível verificar uma correlação positiva (coeficiente de correlação de 0,486) entre estes dois factores (carga microbiana e tempo de armazenamento), com um nível de significância de 99% ( $p < 0.01$ ).

No chicharro, os contagens das Unidades Formadoras de Colónias (CFU) dos microrganismos aeróbios mesofílicos, apresentam um aumento mais ou menos contínuo, sendo que inicialmente (0 dias), verificou-se um valor médio de  $4 \times 10^3$  (CFU / g), com um valor máximo de crescimento aos 14 dias ( $3,55 \times 10^5$  CFU / g) **Fig. 4a e 5b**. De acordo com o coeficiente de correlação de Spearman  $\rho$  (0,655), as contagens das unidades formadora de colónias dos microrganismos mesofílicos aumenta ao longo do tempo de refrigeração, sendo a correlação entre estes dois factores positiva, com um nível de significância de 99% ( $p < 0.01$ ).

Tendo por base as normas para a qualidade microbiológica dos alimentos prontos a comer, é possível verificar que as contagens microbianas mesofílicas, na musculatura da cavala é inferior a  $10^3$  (CFU / g) aos 0 dias de armazenamento, indicando uma qualidade satisfatória para o consumo humano e boas práticas de manuseamento. No que toca ao chicharro, em média, as contagens da microbiota mesofílica presente no músculo aos 0 dias de armazenamento, mostra uma qualidade aceitável ( $10^3 > 10^4$  CFU / g), provavelmente devido ao controlo deficiente da temperatura pós-captura, durante o transporte ou comercialização. O peixe fresco apresenta padrões de qualidade não satisfatório, quando as contagens das colónias aeróbias mesofílicas são superior ou igual a  $10^4$  (CFU / g), padrão que é verificado na cavala e no chicharro após 2 dias de refrigeração, a 4 °C, **Fig. (3a) e (4a)**.

A decomposição do peixe, quando armazenado aerobicamente em gelo, é resultante da presença de bactérias degradativas específicas com níveis variáveis entre  $10^8 - 10^9$  (CFU / g) (Gram and Huss 1996). Neste estudo verifica-se que a temperatura de refrigeração é um factor que têm forte influência nas contagens mesofílicas, permitindo uma degradação do peixe mais rapidamente. Na cavala, as contagens máximas são atingidas ao 9º dia, com um valor aproximado de  $2,4 \times 10^5$  (CFU / g), **Gráfico 3a**. No que toca ao chicharro, as contagens máximas verificam-se no 14º dia, com um valor aproximado de  $5,1 \times 10^5$  (CFU / g), **Gráfico 4a**.

Alimentos ricos em proteínas, tais como o peixe, quando armazenados em condições de aerobiose e gelo, degradam-se devido a presença de associações microbianas, entre as quais podemos encontrar os microrganismos Psicrófilos Gram-negativos, microbiota composta essencialmente por espécies de *Pseudomonas* e *Shewanella putrefaciens* (Gram and Huss 1996).

Na cavala, as contagens iniciais (0 dias) das *Pseudomonas* spp., aportam um valor médio de  $2,82 \times 10^1$  (CFU / g), sendo o valor máximo das contagens das espécies de *Pseudomonas* atingido ao fim de 9 dias de armazenamento ( $1,82 \times 10^4$  CFU / g), **Fig. 3b e 5a**. A nível estatístico, verifica-se que

não existe correlação significativa entre as contagens das unidades formadoras de colónias por grama das espécies de *Pseudomonas* e o tempo de refrigeração, isto é, as contagens de espécies de *Pseudomonas* não variam em função do tempo, mas provavelmente devido à factores intrínsecos e extrínsecos do peixe, nomeadamente, a natureza do peixe, a desova, hábitos alimentares, e condições de armazenamento (Gill 1990; Venugopal 1990; Connell 1995; Ashie *et al.* 1996; Huis in't Veld 1996), sendo também importante a interacção e influência de outros microrganismos, (Gram *et al.* 2002).

No que toca ao chicharro, verifica-se que as contagens das unidades formadoras de colónias das espécies de *Pseudomonas* são detectáveis a partir do 2º dia (**Fig. 5b**), apresentando um valor de  $1,63 \times 10^2$  CFU / g, sendo o valor máximo das unidades formadoras de colónias atingido no 14º dia de armazenamento ( $1,55 \times 10^5$  CFU / g), **Fig. 4b**. Estatisticamente, não há correlação significativa entre o aumento das contagens do número de CFU / g de espécies de *Pseudomonas* e o tempo de refrigeração. Estas contagens são muito variáveis, devido possivelmente aos mesmos factores referidos anteriormente para a cavala.

É interessante notar que, as contagens de *Pseudomonas* spp. tanto na cavala como no chicharro não são lineares (**Fig. 3b** e **4b**, respectivamente), apresentando picos com valores elevados nas contagens ao longo do tempo de refrigeração, sendo possível visualizar-los após diminuições bruscas destes valores durante o armazenamento. Este facto pode ser resultante da forte competição existente entre espécies de *Pseudomonas* e *S. putrefaciens* (Koutsoumanis *et al.* 1999), sendo que as *Pseudomonas* spp., podem inibir o crescimento de bactérias produtoras de  $H_2S$  (tal como *S. putrefaciens*), devido a sua capacidade de produzir sideróforos (Chytiri *et al.* 2004). Os sideróforos são de particular importância pois estabelecem uma forte ligação com o ferro (Gram *et al.* 2002), sendo um ião essencial usado pelos microrganismos na respiração bacteriana e reacções redox (Gram *et al.* 2002). Têm sido demonstrado que para muitos produtos de pescaria, a concentração de ferro é baixa (Gram 1994) e que em concentrações limitantes deste ião, os sideróforos produzidos pelas espécies de *Pseudomonas*, têm uma forte capacidade de inibição dos sideróforos produzidos pela espécie *S. putrefaciens* (Gram 1993).

As contagens iniciais (0 dias) das bactérias entéricas na cavala, apresentam um valor médio de  $8,53 \times 10^0$  (CFU / g), com contagens máximas de  $2,76 \times 10^3$  (CFU / g) ao fim de 10 dias de armazenamento, **Fig. 3c** e **5a**. Embora, ao longo do tempo de refrigeração as contagens de Enterobacterias na cavala apresentam um aumento não linear, é possível verificar uma correlação positiva (coeficiente de correlação de 0.49) entre estes dois factores (carga microbiana e tempo de armazenamento), com um nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).

No chicharro, as contagens iniciais (0 dias) de Enterobacterias, apresentam um valor médio de  $5,4 \times 10^1$  (CFU / g), atingindo no 7º dia de armazenamento o valor máximo de  $1,03 \times 10^4$  (CFU / g), atingido no 7º dia de armazenamento, **Fig. 4c** e **5b**. De acordo, com o coeficiente de correlação de Spearman'rho (0,508), as contagens de Enterobacterias aumenta ao longo do tempo de refrigeração, sendo a correlação entre estes dois factores positiva, com um nível de significância de 99% ( $p < 0,001$ ).

Tendo por base as normas para a qualidade microbiológica dos alimentos prontos a comer, é possível verificar que as contagens microbianas de *Enterobacteriaceae*, na musculatura da cavala e do chicharro, são inferior a 100 (CFU / g) aos 0 dias de armazenamento, indicando uma qualidade satisfatória para o consumo humano e boas práticas de manuseamento. O peixe apresenta padrões de

qualidade não satisfatório, quando as contagens de Enterobacterias são superior ou igual a  $10^4$  (CFU / g), padrão que é verificado no chicharro após 7 dias de refrigeração, a 4 °C, (**Fig. 4c**).

A cavala (*Scomber colias*), é um peixe pertencente a família *Scombridae* (Collette and Nauen 1983), os quais possuem níveis elevados de histamina na musculatura após captura, resultante de processos proteolíticos efectuados por bactérias descarboxilases mas sem a formação de indicadores de degradação sensorial (Sapin-Jaloustre and Sapin-Jaloustre 1957; Lehane and Olley 2000). Este facto, justifica os resultados obtidos nas contagens de Enterobacterias da cavala (**Fig. 3c**), as quais, segundo as normas, não apresentam padrões de qualidade não satisfatória ao longo do tempo de armazenamento.

As bactérias entéricas, são responsáveis pela descarboxilação da histidina (Frank 1985; Taylor and Summer 1986). Descarboxilases, actuam sobre a histidina e outros aminoácidos presentes no músculo dos peixes, formando histamina e outras aminas biogénicas, durante a degradação dos produtos (Lehane and Olley 2000).

No presente estudo, e a partir da cavala identificaram-se os seguintes isolados entéricos, *Citrobacter freundii* (índice de identificação de 99.4%), *Aeromona hydrophila* (índice de identificação de 96.4%) e *Escherichia vulneris* (índice de identificação de 82.2%).

É importante salientar que a espécie *Citrobacter freundii* é referida como produtora de elevados níveis de histamina na degradação do peixe a uma temperatura de 30 °C (Behling and Taylor 1982).

Não foi possível a identificação com as galerias API 20E dos vários isolados entéricos obtidos a partir do chicharro.

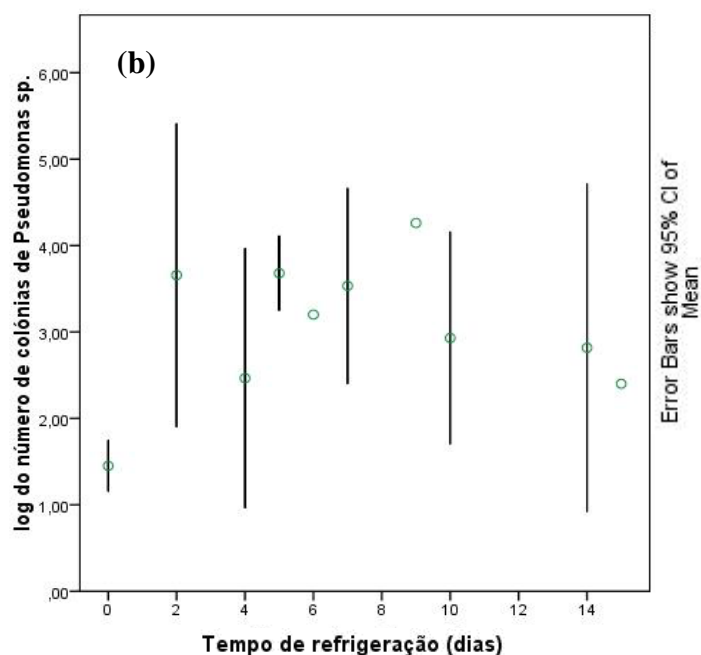
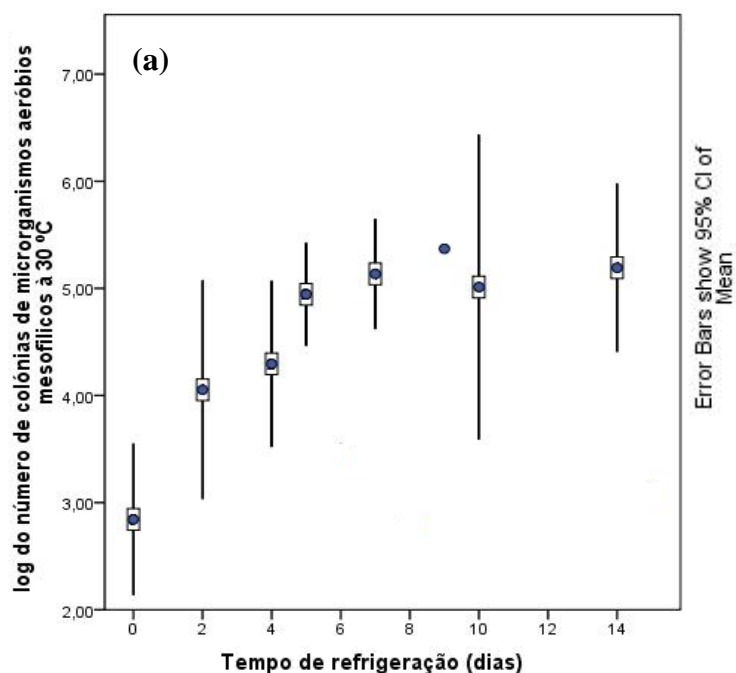
Na cavala, as contagens iniciais (0 dias) do género *Enterococcus*, apresenta um valor médio de  $3,15 \times 10^1$  (CFU / g) com contagens máximas de  $6,35 \times 10^2$  (CFU / g) ao fim de 14 dias de armazenamento, **Fig. 3d** e **5a**. Embora, ao longo do tempo de refrigeração, as contagens de *Enterococcus* sp. apresentam um aumento não linear para a cavala, é possível verificar uma correlação positiva (coeficiente de correlação de 0,713), entre estes dois factores (carga microbiana e tempo de armazenamento), com um nível de significância de 99% ( $p < 0,01$ ).

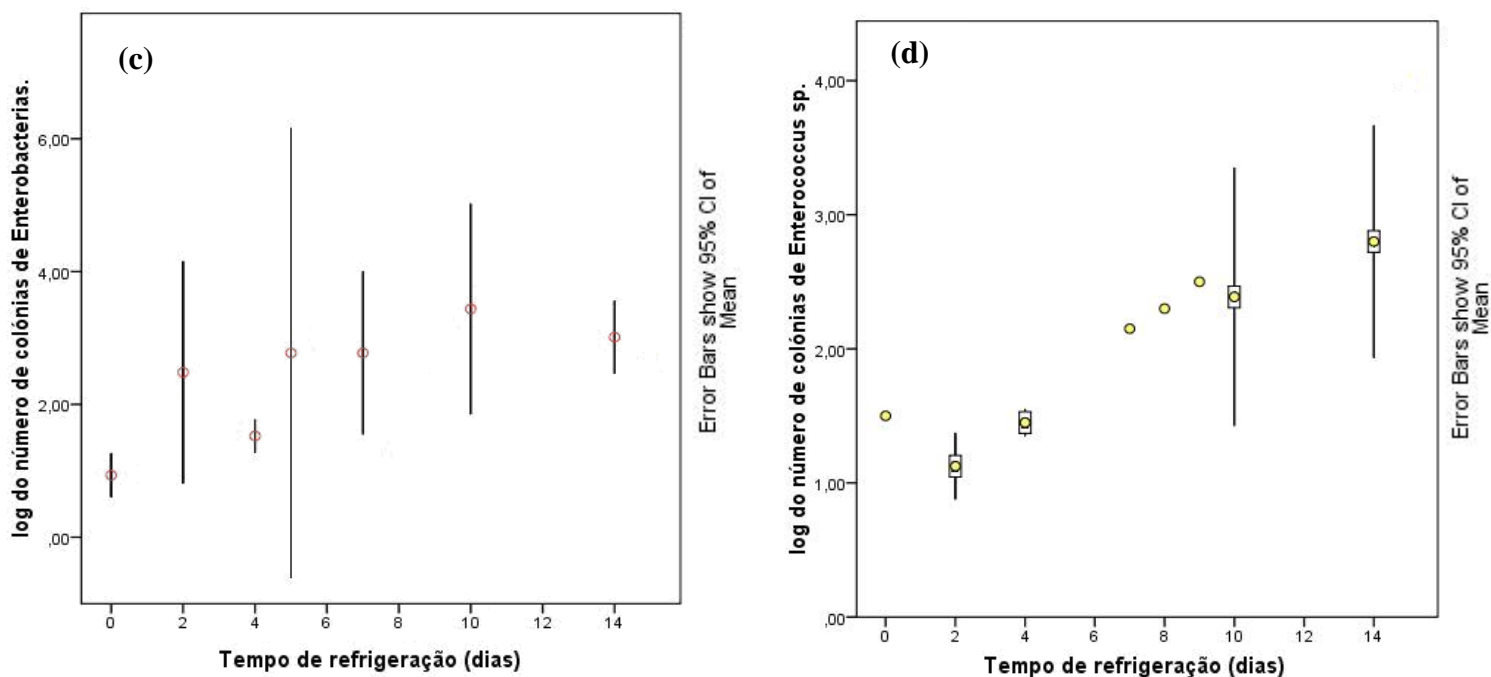
No chicharro, verifica-se que as contagens das bactérias do género *Enterococcus*, são detectáveis a partir do 2º dia (**Fig. 5b**), apresentando um valor médio de  $4,3 \times 10^1$  (CFU / g), com contagens máximas de  $6,5 \times 10^2$  (CFU / g) no 14º dia de armazenamento, **Fig. 4d**. Estatisticamente, há uma correlação positiva (coeficiente de correlação de 0,680) e significativa a nível do 99% ( $p < 0,01$ ) entre o aumento das contagens de CFU / g de *Enterococcus* sp. e o tempo de refrigeração.

As bactérias do género *Enterococcus*, habitam predominantemente no tracto gastrointestinal do homem e dos animais, porém, também estão presentes no solo, na água, nas plantas, nos vegetais e devido a sua elevada resistência e tolerância, encontram-se em ambientes de condições adversas (Giraffa 2002). O género *Enterococcus*, é usado como indicador de contaminação fecal da água e dos alimentos (Hackney et al. 1979a), quando os peixes são capturados a partir de meios marinhos não contaminados, não se verifica a presença destes contaminantes fecais (Spencer and Georgala 1957). No caso da cavala, verificou-se a presença de bactérias do género *Enterococcus* a fresco (0 dias) e ao longo do tempo de armazenamento (**Fig. 5a**), sendo indicativo de uma possível contaminação do meio marinho onde o peixe foi capturado e/ou manipulação inadequada do alimento quando comercializado, o qual ao longo do tempo de refrigeração aumenta o grau de deterioração do peixe.

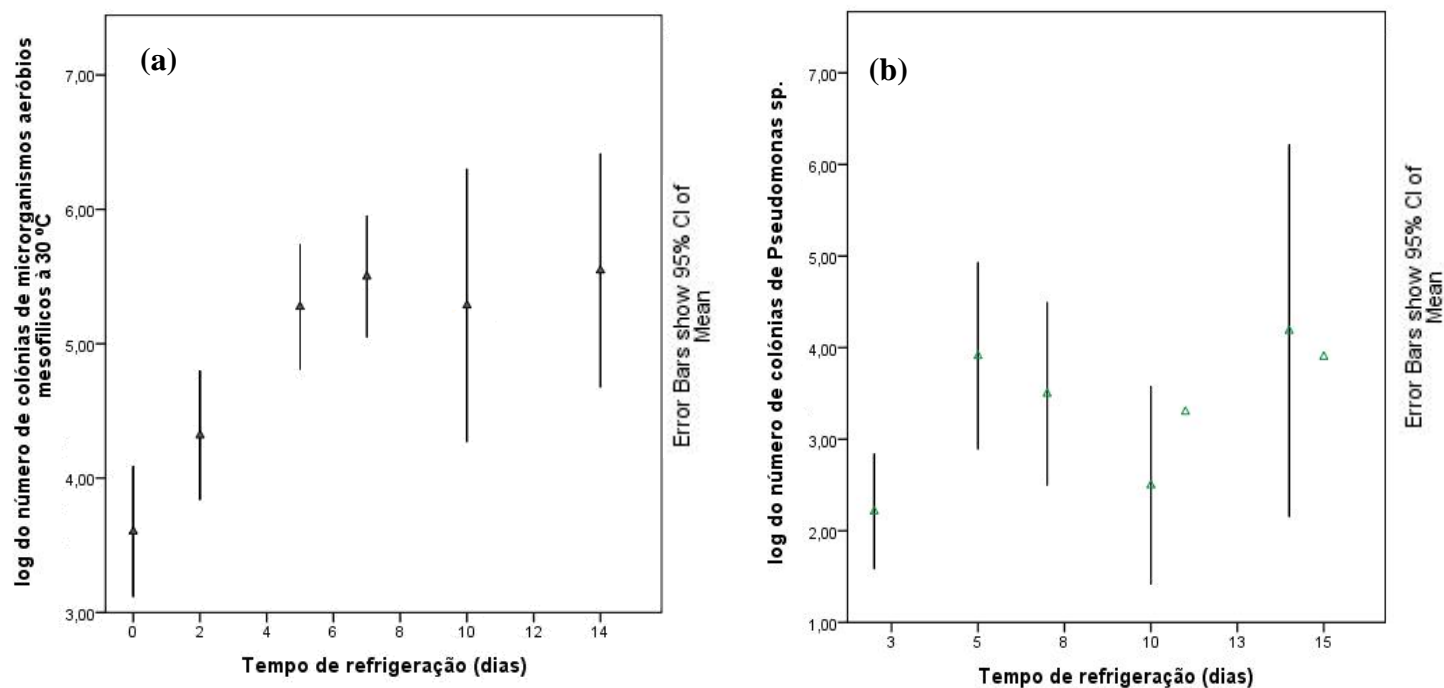
No chicharro, as contagens de *Enterococcus* sp., só são detectadas a partir do 2º dia de armazenamento e em aumento constante ao longo do tempo de armazenamento (**Fig. 5b**), isto demonstra que o aumento do número das contagens de *Enterococcus* sp. é influenciado inicialmente por factores intrínsecos do peixe (tais como as reacções bioquímicas ocorridas pós-morte), e/ou por interacção e influência de outros microrganismos com melhor capacidade competitiva.

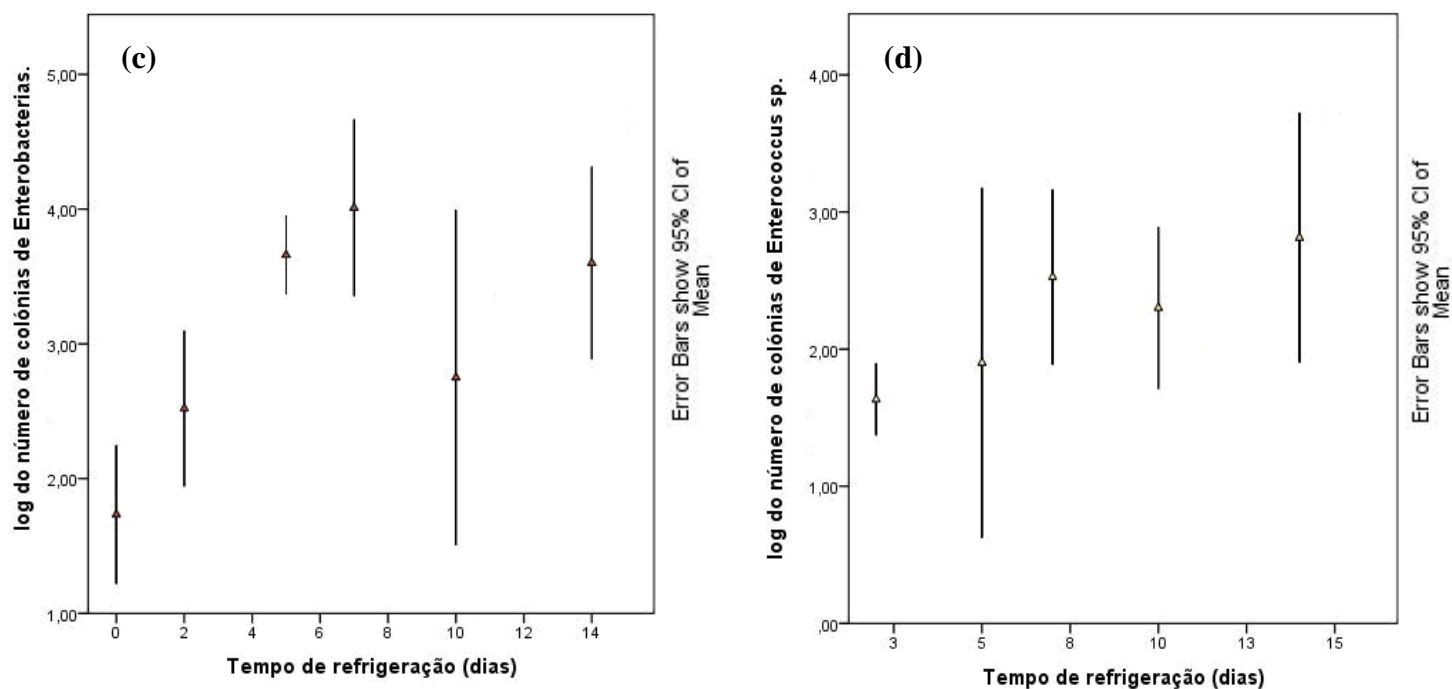
Tanto na cavala como no chicharro, é possível verificar graficamente grande variabilidade nas contagens dos diversos microrganismos analisados ao longo do tempo de armazenamento. Este facto poderá ser resultado da variabilidade obtida nas contagens ao longo dos meses de amostragem para os tempos de armazenamento analisados, sendo a correlação entre estes dois factores (aumento da carga microbiana e os meses de amostragem) estatisticamente não significativa.



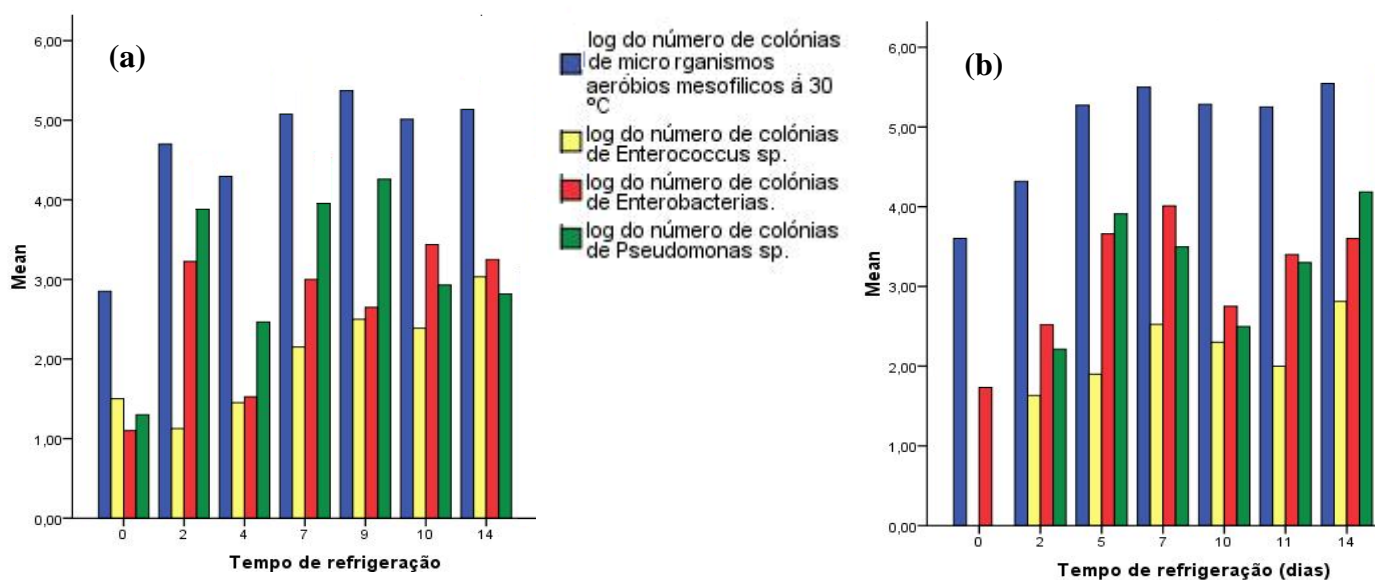


**Fig. 3** – Quantificação dos microrganismos presentes no músculo de cavala (*Scomber colias*) ao longo do tempo de armazenamento a 4 °C. **(a)** Microrganismos aeróbios, **(b)** *Pseudomonas* spp., **(c)** Enterobactérias, **(d)** *Enterococcus* sp.





**Fig. 4** – Quantificação dos microrganismos presentes no músculo de chicharro (*Trachurus picturatus*) ao longo do tempo de armazenamento a 4 °C. **(a)** Microrganismos aeróbios, **(b)** *Pseudomonas* spp., **(c)** Enterobactérias, **(d)** *Enterococcus* sp.



**Fig. 5** – Variação dos microrganismos analisados ao longo do tempo de armazenamento a 4 °C, **(a)** Cavala e **(b)** Chicharro.

## 2. pH

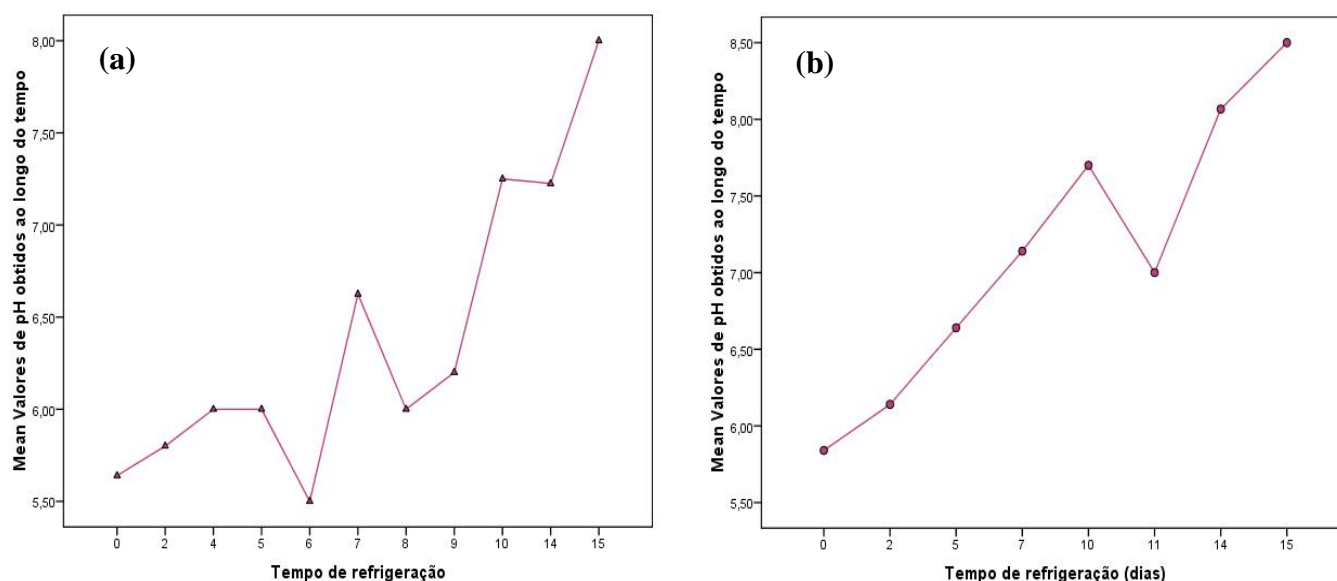
De uma forma generalizada, após a morte dos peixes, a actividade celular continua na musculatura, devido a presença de reservas energéticas, principalmente o glicogénio. Devido a hidrólise do glicogénio, há acumulação de ácido láctico, provocando assim uma diminuição do pH muscular (Davis 1995). No entanto, muitos peixes contêm poucos hidratos de carbono ( $< 0,5\%$ ) no tecido muscular e só uma pequena parte de ácido láctico é produzido pós-morte, resultando elevados valores de pH pós-morte ( $> 6,0$ ) (Gram and Huss 1996; Tzikas *et al.* 2007b).

Na cavala, os valores de pH obtidos ao longo do tempo de armazenamento tendem a aumentar, embora de forma não linear. O valor médio de pH verificado a fresco (0 dias) é de 5,64. O meio ácido é verificado na musculatura até o 9º dia de armazenamento, provavelmente devido a acumulação de ácido láctico e metabolitos resultantes da actividade celular microbiana. O valor máximo de pH é atingido no 15º dia de armazenamento com um valor médio de 8,0 (**Fig. 6a**). Este aumento de valores de pH poderá ser resultado de uma luta extensiva e stress provocado por longos períodos de imersão (Skjervold *et al.* 2001; Esaiassen *et al.* 2004) e/ou devido ao “gaping” do músculo (Love 1980). O aumento dos valores de pH ao longo do tempo de armazenamento é estatisticamente significativo, com um coeficiente de correlação de 0,789, para um nível de significância de 99% ( $p < 0,01$ ). Relacionando os valores de pH obtidos ao longo do tempo de armazenamento com os microrganismos analisados no musculo da cavala, foi possível verificar a existência de uma correlação estatisticamente significativa, com um coeficiente de correlação de 0,710, para um nível de significância de 99% ( $p < 0,01$ ) entre as contagens de *Enterococcus* sp. e a variação dos valores de pH (**Fig. 7a**). O aumento das contagens de *Enterococcus* sp. ao longo dos valores de pH analisados, é não linear, porém, o valor máximo das contagens de *Enterococcus* sp. é atingido em meio básico, correspondendo a um valor de pH de 8,0 e a 15 dias de armazenamento. No que toca a relação entre as contagens dos microrganismos mesofílicos, bactérias entéricas e *Pseudomonas* sp. com os valores de pH obtidos, verifica-se ser uma relação não significativa estatisticamente e muito variável, observando-se que as contagens máximas destes microrganismos correspondem a valores de pH diferentes (**Fig. 7b-d**, respectivamente), podendo ser resultado da interacção entre os mesmos. Relativamente a qualidade sensorial, verifica-se que a medida que os valores de pH aumentam, a qualidade sensorial da cavala deteriora-se gradualmente, sendo considerado o peixe impróprio para venda para valores de pH superior a 7,2 (**Fig 8a**). A deterioração da qualidade sensorial do músculo da cavala ao longo do aumento dos valores de pH é estatisticamente significativa, com um coeficiente de correlação de 0,755, para um nível de significância de 99% ( $p < 0,01$ ).

O chicharro, apresenta um aumento de pH ao longo do tempo de armazenamento mais linear do que a cavala, sendo que a fresco (0 dias), o valor médio de pH verificado é de 5,84. O meio ácido é verificado na musculatura até o 6º dia de armazenamento, provavelmente devido a acumulação de ácido láctico e metabolitos resultantes da actividade celular microbiana (tal como acontece na cavala), no entanto, comparativamente à cavala, a acidez na musculatura do chicharro verifica-se durante menos dias, sendo possível pensar que a características próprias da espécie poderão influenciar a carga microbiana e o pH do músculo. O valor máximo atingido é no 15º dia com um valor médio de pH de 8,50 (**Fig. 6b**). Este aumento de valores de pH, poderá ser resultado de uma luta extensiva e stress provocado por longos períodos de imersão (Skjervold *et al.* 2001; Esaiassen *et al.* 2004) e/ou devido ao “gaping” do músculo (Love 1980). Estatisticamente, verificou-se que existe uma correlação

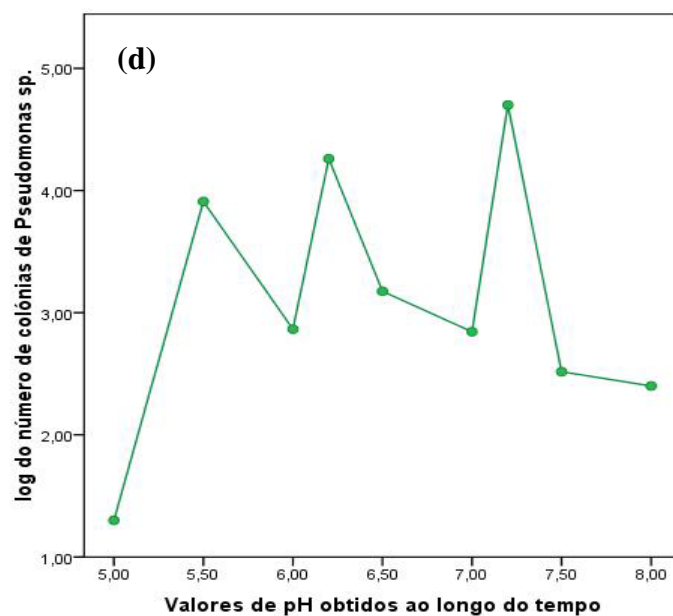
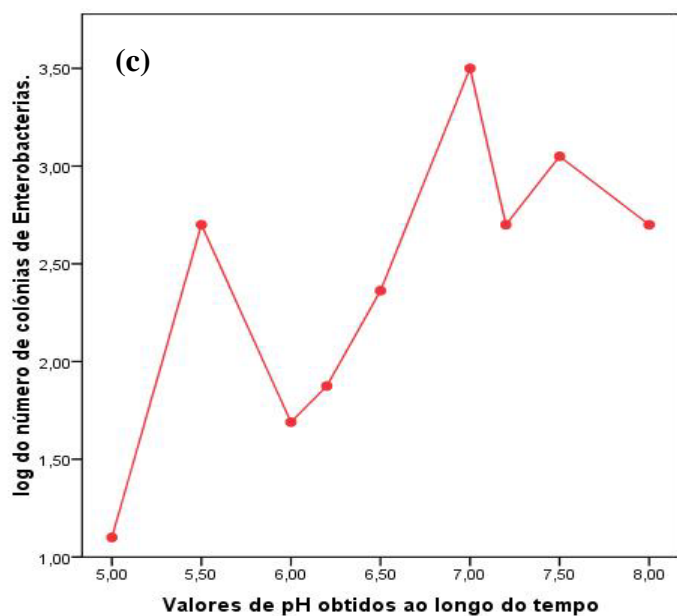
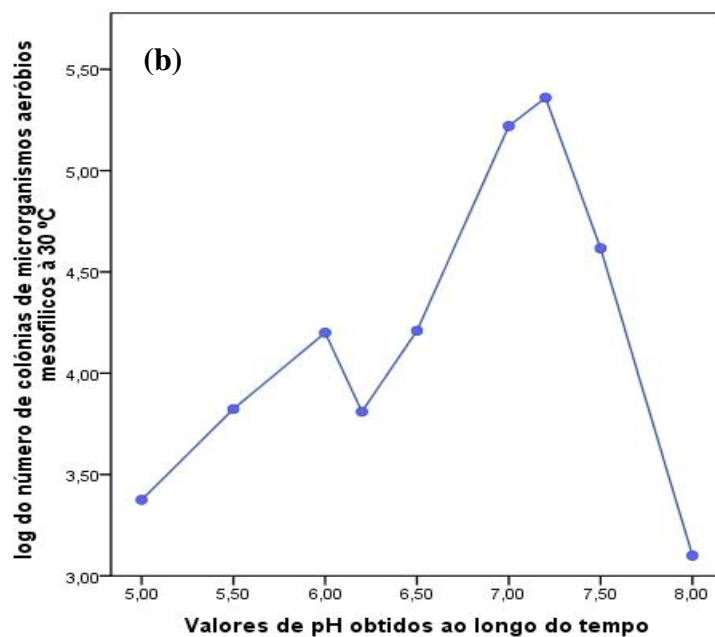
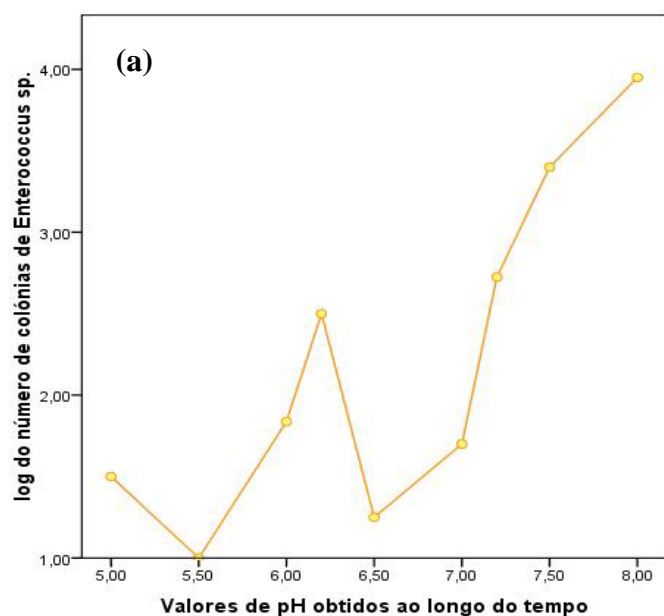
significativa (coeficiente de correlação de 0,887) entre o aumento dos valores de pH e o tempo de armazenamento, para um nível de significância de 99% ( $p < 0,01$ ). Relacionando os valores de pH obtidos ao longo do tempo de armazenamento com os microrganismos analisados no músculo do chicharro, verificou-se uma relação estatisticamente significativa entre as contagens dos microrganismos mesofílicos e bactérias entéricas, e o aumento dos valores de pH (**Fig. 9b-c**, respectivamente), com um coeficiente de correlação de 0,706 e 0,499, respectivamente, para um nível de significância de 99% ( $p < 0,01$ ). A contagem de *Enterococcus* sp. também apresenta uma relação estatisticamente significativa com o aumento dos valores de pH, para um nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ) e um coeficiente de correlação de 0,631 (**Fig. 9a**). Os valores máximos atingidos das contagens dos microrganismos mesofílicos, bactérias entéricas e *Enterococcus* sp., são variáveis entre si, mas são atingidos em meio básico, com valores de pH compreendidos entre os 8,0 – 8,5, podendo inferir-se que são microrganismo responsáveis pela deterioração gradual do chicharro e cujos acção metabólica provoca este aumento. Nas contagens de *Pseudomonas* sp., não foi possível verificar a existência de uma relação estatisticamente significativa com o aumento dos valores de pH, sendo o valor máximo correspondente a um valor de pH de 6,2 (**Fig. 9d**). Relativamente a qualidade sensorial, verifica-se que a medida que os valores de pH aumentam, a qualidade sensorial do chicharro deteriora-se gradualmente, sendo considerado o peixe impróprio para venda para valores de pH superior a 7,5 (**Fig. 8b**). A deterioração da qualidade sensorial do músculo da cavala ao longo do aumento dos valores de pH é estatisticamente significativa, com um coeficiente de correlação de 0,892, para um nível de significância de 99% ( $p < 0,01$ ).

Para além dos factores referidos, o pH pode variar consideravelmente dentro de uma espécie, de acordo com o método de captura (Esaiassen *et al.* 2004). Estas variações nos valores de pH, tem consequências importantes na microbiota do peixe, dado que permite o crescimento de bactérias degradativas sensíveis, tais como a *S. putrefaciens* (Gram and Huss 1996).

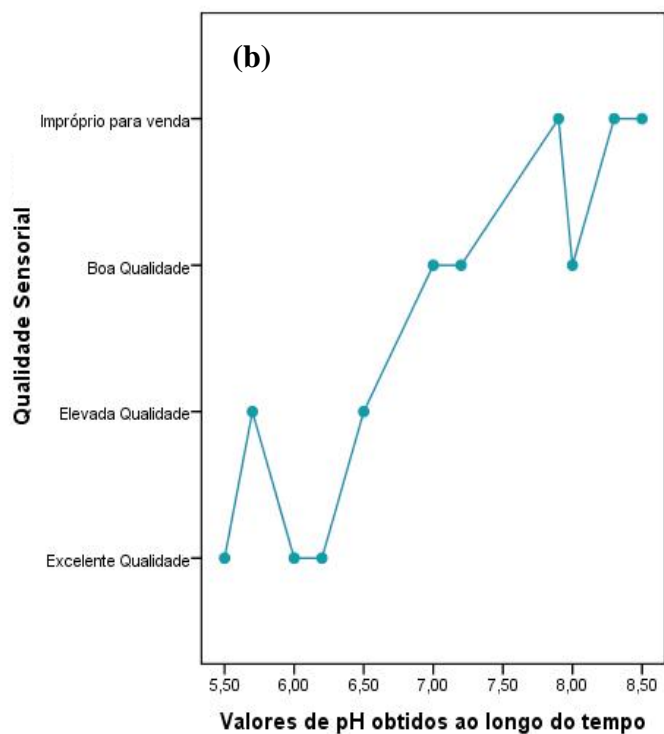
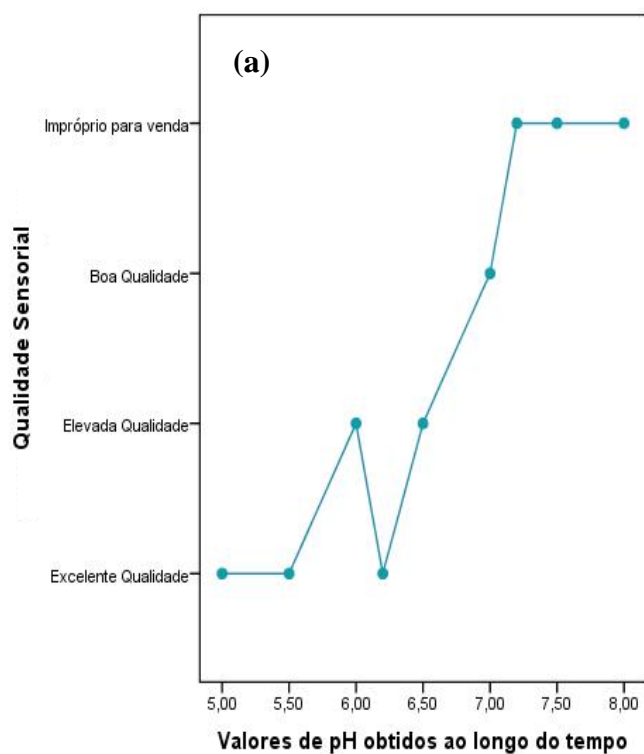


**Fig. 6** – Variação dos valores médios de pH ao longo do tempo de armazenamento a 4 °C, **(a)** Cavala, **(b)** Chicharro.

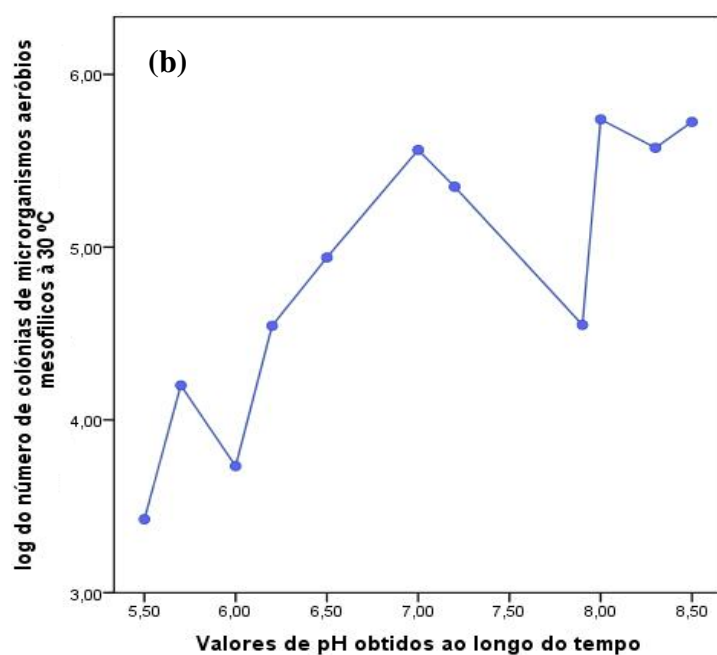
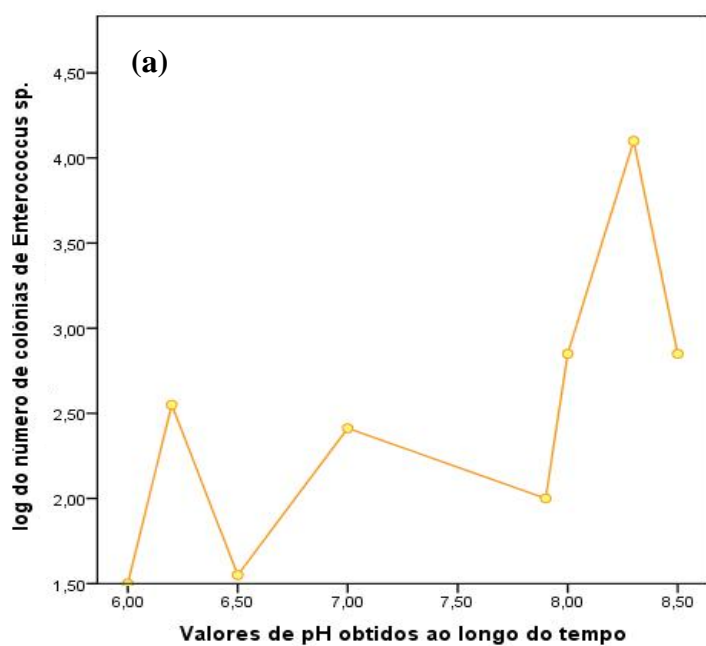


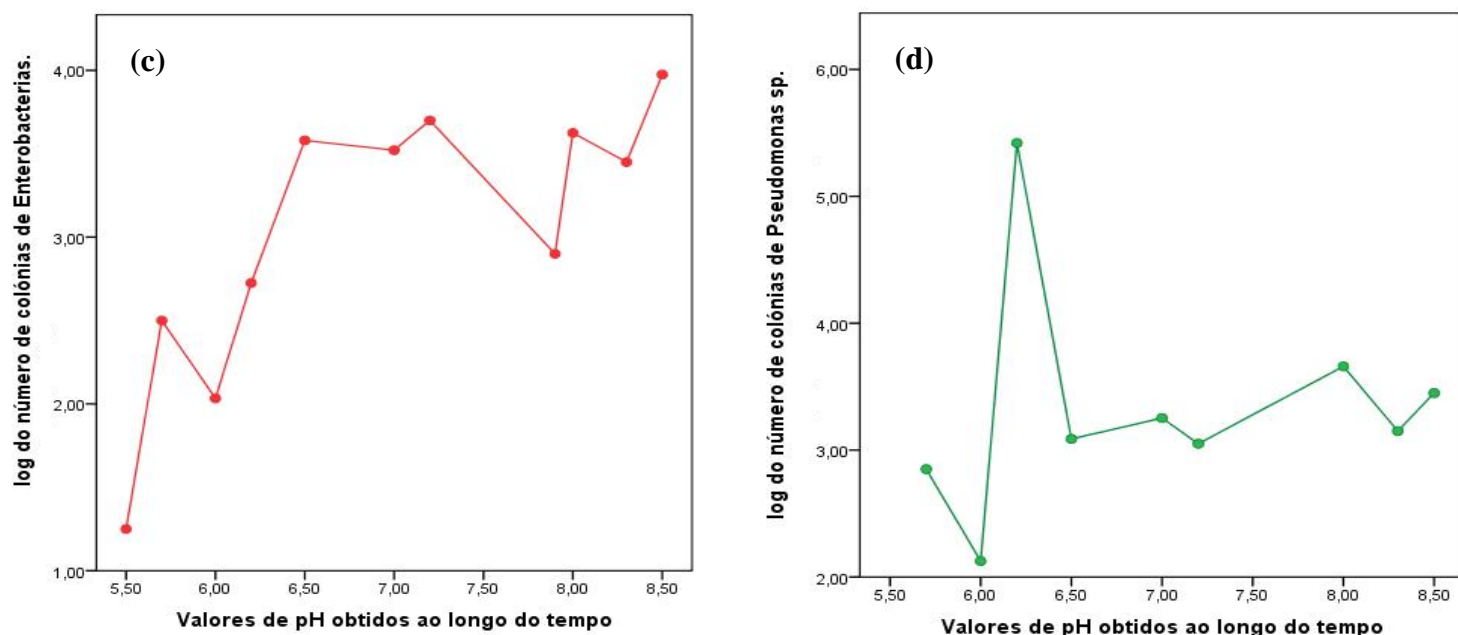


**Fig. 7** – Quantificação dos microrganismos e variação de pH no músculo de cavala (*Scomber colias*) ao longo do tempo de armazenamento. **(a)** *Enterococcus* sp., **(b)** Microrganismo mesofílico, **(c)** Enterobactérias e **(d)** *Pseudomonas* sp.



**Fig. 8** – Qualidade sensorial e valores de pH do músculo de peixe ao longo do tempo de armazenamento. **(a)** Cavala, **(b)** Chicharro.





**Fig. 9** – Quantificação dos microrganismos e variação de pH no músculo de chicharro (*Trachurus picturatus*) ao longo do tempo de armazenamento. **(a)** *Enterococcus* sp., **(b)** Microrganismo mesofílicos, **(c)** Enterobactérias e **(d)** *Pseudomonas* sp.

### 3. Análise Sensorial

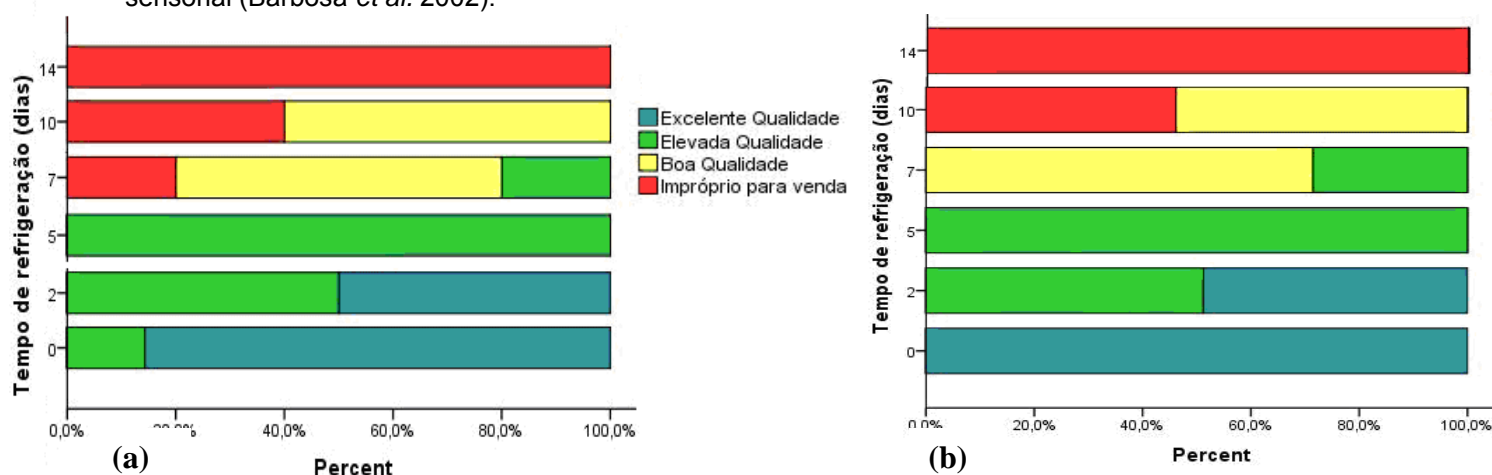
Alterações características ocorrem nos peixes pós-morte, especialmente nas propriedades sensoriais e composição, as quais são dependentes da espécie de peixe e do método de armazenamento (FAO 2002; Martinsdóttir 2002).

O grau de frescura da cavala e do chicharro, são visualizadas nos **Fig. 10a** e **10b**, respectivamente. A Fresco (0 dias) verifica-se que todas as amostras de chicharro analisado apresentaram uma qualidade Excelente (E), porém, apenas 86% das cavalas analisadas a fresco, foram registadas com qualidade Excelente (E). Ao fim de 2 dias de armazenamento a 4 °C, observou-se que 50% das cavalas e chicharros analisados, apresentavam Qualidade Excelente (E) e os 50% restantes apresentavam Elevada Qualidade (A), esta mesma categoria foi atribuída a 100% das amostras de cavalas e chicharros analisados com 5 dias de armazenamento. Aos 7 dias de armazenamento, verifica-se na cavala uma diminuição no grau de frescura, de uma Elevada qualidade para uma qualidade Imprópria para venda (A → C), sendo observado que 60% das amostras apresentavam uma Boa qualidade (B). No chicharro, verifica-se também uma diminuição no grau de frescura de Elevada qualidade para uma qualidade Boa (A → B), sendo esta última categoria representada por 71% das amostras analisadas. Ambas as espécies aos 10 dias de armazenamento apresentam uma degradação continua do grau de frescura da musculatura, de uma Boa qualidade para uma qualidade imprópria para venda (B → C). Na cavala 60% das amostras apresentavam boa qualidade e 40% eram considerados impróprios para venda, no chicharro verificou-se que 54% das amostras apresentavam Boa qualidade (B) e 46% eram consideradas impróprias para venda. Ao fim dos 14 dias de armazenamento, as amostras de cavala e de chicharro analisados, apresentavam-se impróprios para venda.

Cada espécie apresenta diferenças significativas no seu grau de frescura ao longo do tempo, sendo que para a cavala o grau de frescura diminui ao longo do tempo de armazenamento, com um coeficiente de correlação de 0,898, para um nível de significância de 99% ( $p < 0,01$ ). No chicharro é possível verificar que a mesma correlação entre estes dois factores, tem um coeficiente de correlação de 0,940, para um nível de significância de 99% ( $p < 0,01$ ).

Os resultados mostram que a cavala e o chicharro são viáveis para consumo até 10 e 7 dias de armazenamento a 4 °C, respectivamente. No entanto, segundo o nosso estudo ambas as espécies de peixes analisados apresentam-se impróprios para venda a partir do 14º, tendo em conta a qualidade que estes apresentavam no 10º dia, poder-se-á estimar que a partir do 11º/12º dia de armazenamento a 4º, estes já se encontrariam impróprios para consumo. Estudos prévios sobre alguns peixes do género *Trachurus*, demonstram que a qualidade sensorial diminui após 5 ou 6 dias de armazenamento em gelo, apresentando padrões de inaceitabilidade no 8º dia (Simeonidou *et al.* 1998; Losada *et al.* 2005; Rodríguez *et al.* 2005). Um outro estudo feito a peixes das espécies *Trachurus mediterraneus* e *Trachurus picturatus*, demonstrou que o tempo de vida útil apto para consumo foi de 10 e 7 dias, respectivamente (Tzikas *et al.* 2007a) valores muito semelhantes aos obtidos para o chicharro no presente trabalho.

A presença de características como o rigor mortis, o brilho metálico e iridescência da pele, a presença de guelras vermelhas e brilhantes que possuem odor fresco, indicam que os peixes estão frescos. Alterações como a perda de brilho e iridescência da pele, cores baças da pele e clareamento das brânquias, são indicativos da perda considerável da qualidade do peixe (Chytiri *et al.* 2004). Estas alterações, são resultantes de enzimas autolíticas ou crescimento microbiano. A rancidez resulta da oxidação das gorduras e é um indicador de decomposição (Liyhs *et al.* 2007), porém alterações na textura do músculo, podem ser o resultado da acção de enzimas autolíticas presentes nos tecidos dos peixes, com um maior impacto na deterioração da textura e posterior decomposição da mesma (Truelstrup Hansen *et al.* 1996; Truelstrup Hansen *et al.* 1998). As alterações dos odores e sabores, são o principal resultado da actividade microbiana (Paludan-Müller *et al.* 1998; Dondero *et al.* 2004), sendo que contagens entre  $10^6$  e  $10^7$  CFU/g de peixes armazenados em gelo, provocam rejeição sensorial (Barbosa *et al.* 2002).

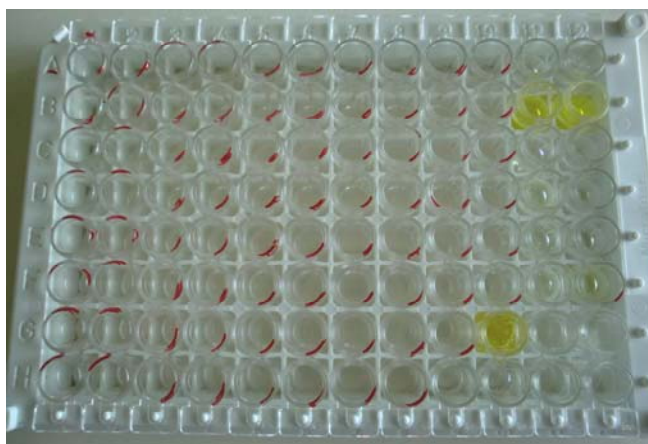


**Fig. 10** – Gradiente de Frescura **(a)** Cavala e **(b)** Chicharro, em quatro categorias (Excelente (E), Elevada Qualidade (A), Boa Qualidade (B), Impróprio para venda (C)), de acordo com a Comunidade Europeia.

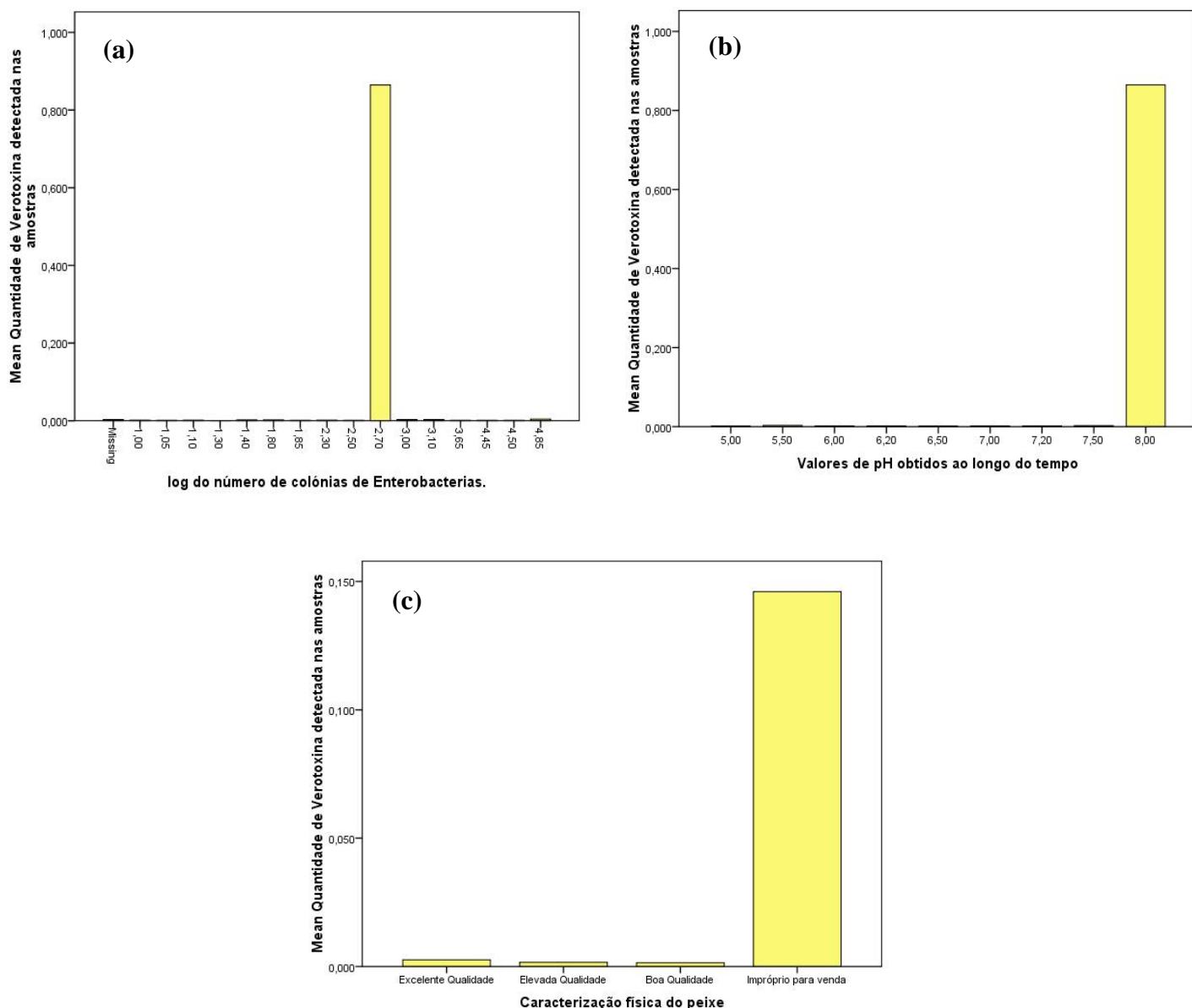
#### 4. Análise da Verotoxina 1 e 2 e da Enterotoxina Estafilocócica

Das 30 amostras de músculo de cavala analisados para a detecção da verotoxina 1 e 2, obteve-se um único resultado positivo (**Fig. 11**), com 0,865 Unidade de toxina por grama de peixe, cujo período de armazenamento a 4 °C foi de 15 dias. No chicharro, não se detectou a presença da verotoxina 1 e 2, nas amostras analisadas. Segundo as normas, na análise de alimentos a verotoxina produzida pela *E. coli* O157 – H7, têm que estar ausente em 25 g de peixe. Na cavala não foi possível verificar correlação significativa entre a quantidade de verotoxina 1 e 2 e o pH, o aumento das contagens das bactérias entéricas por grama de peixe, e a qualidade sensorial do peixe, ao longo do tempo de refrigeração. A quantidade máxima de verotoxina 1 e 2, foi detectada em amostras de cavala com 15 dias de armazenamento, correspondendo a  $5,1 \times 10^2$  (CFU/g) de bactérias entéricas, pH muscular básico (8,0) e uma qualidade sensorial imprópria para venda (**Fig. 12a, 12b e 12c**, respectivamente).

O aparecimento deste tipo de toxina nos alimentos poderá ser resultado da presença do microrganismo produtor ou então devido a presença da toxina sem o microrganismo. Um estudo em peixes de água doce, comprovou a existência do gene responsável pela formação da verotoxina 1 (vtx1) em duas espécies bacterianas (*Citrobacter freundii* e *Hafnia alvei*) da família *Enterobacteriaceae* (Lindberg *et al.* 1998a). Isto é particularmente interessante, pois o *Citrobacter freundii*, foi uma espécie identificada na cavala e que, tal como a espécie *Hafnia alvei*, são responsáveis pela degradação da qualidade do músculo do peixe.



**Fig. 11** – Imagem representativa do resultado positivo obtido na detecção da Verotoxina 1 e 2 da cavala, através do kit de detecção RIDASCREEN® Verotoxin.



**Fig. 12** – Quantidade de verotoxina 1 e 2 detectada no músculo de cavala, *Scomber colias*, em função de **(a)** pH, **(b)** Qualidade Sensorial, **(c)** log (CFU/g) *Enterobacteriaceae*.

Existem determinadas condicionantes que influenciam o crescimento do *Staphylococcus aureus* e a produção da enterotoxina nos alimentos. Aleatoriamente, foram analisadas 6 amostras de cavalas e de chicharros, aos (0, 2, 5, 7, 10 e 14 dias de armazenamento a 4 °C), para a presença da enterotoxina (A, B, C, D, E), produzida pelo *Staphylococcus aureus*. De acordo com esta análise, obtiveram-se resultados positivos (**Fig. 15**) para todas as amostras analisadas, e as quantidades de toxina presente no músculo, podem ser visualizadas na **Tabela 3**.

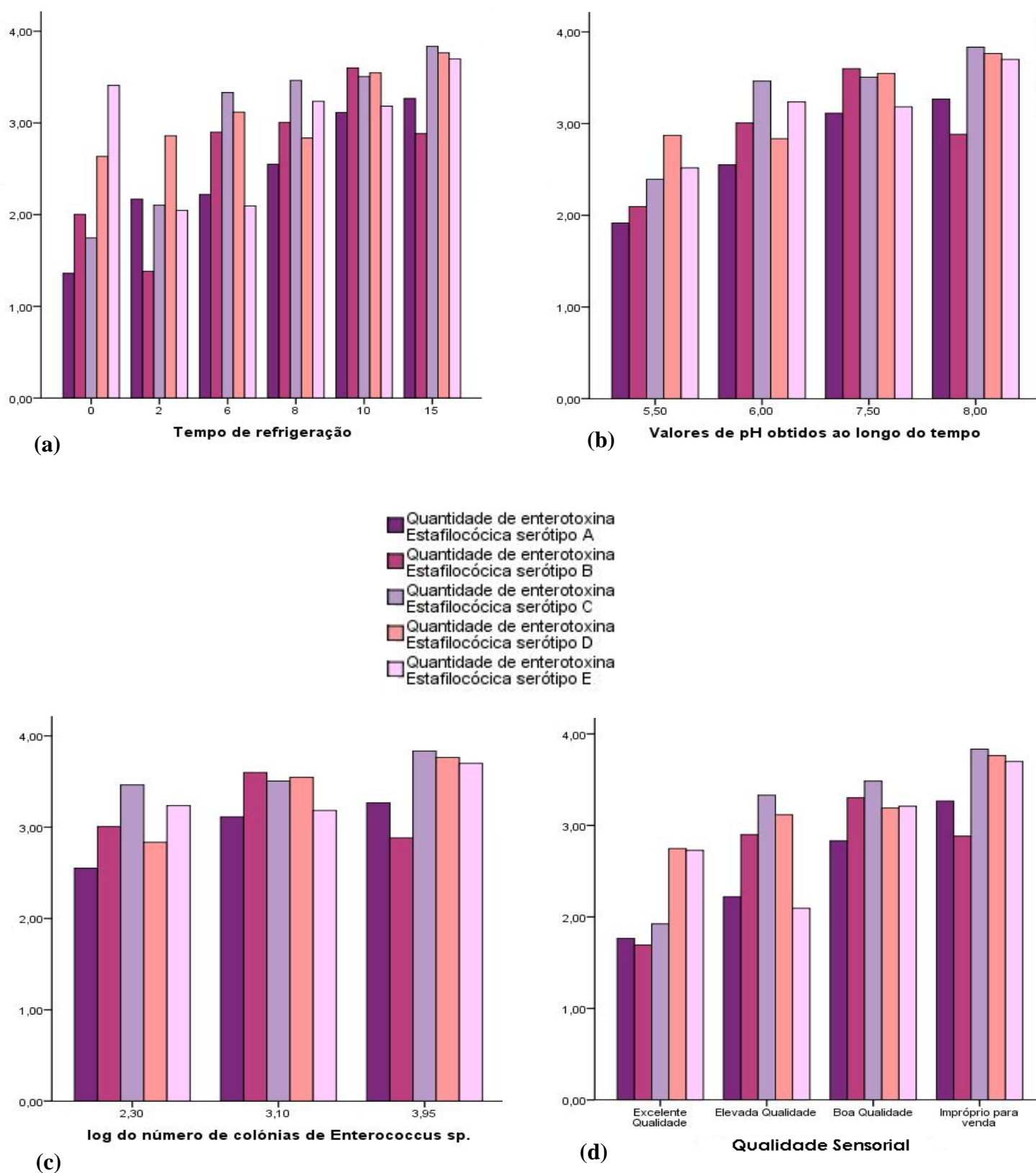
Na cavala, os serótipos A, C e D, apresentam correlação significativa ao longo do tempo de refrigeração com um nível de significância de 99% e um coeficiente de correlação de Spearman'rho de 1,0 (serótipo A e C) e 0,829 (serótipo D), sendo que de forma mais ou menos linear, a quantidade de enterotoxina correspondente aos serótipo A, C e D tende aumentar ao longo do tempo de refrigeração (**Fig. 13a**). A sua presença no peixe analisado a fresco (0 dias) e ao fim de 2 dias, poderá indicar condições higiosanitárias desfavoráveis. A quantidade de enterotoxina correspondente aos serótipos A

e C tendem aumentar ao longo dos valores de pH analisados (**Fig. 13b**), sendo esta correlação estatisticamente significativa ao nível do 99% e com um coeficiente de correlação de 0,941. O valor máximo de enterotoxina detectado, corresponde a um pH básico (8,0) e de acordo com análises anteriores, este valor é atingido no 15º dia de armazenamento. A correlação entre a enterotoxina estafilocócica e o aumento das contagens de CFU/g de *Enterococcus* sp., verificou-se ser estatisticamente significativa para os serótipos A, C e D (**Fig. 13c**). o valor máximo de enterotoxina encontrada corresponde a uma carga de microbiana de  $8,95 \times 10^3$  (CFU/g). Relativamente a qualidade sensorial, verificou-se que a quantidade de enterotoxina aumenta, a medida que o músculo da cavala perde qualidade sensorial (**Fig. 13d**), sendo esta correlação estatisticamente significativa para os serótipos A e C, com um coeficiente de correlação de 0,971 para um nível de significância de 99%. O valor máximo é atingido quando o peixe já se encontra impróprio para venda, e poderá ser resultante da degradação continua que o peixe apresenta ao longo do tempo de refrigeração.

No chicharro, não foi possível verificar correlação estatisticamente significativa entre a quantidade de enterotoxina estafilocócica (serótipos A,B,C,D e E) detectada e os parâmetros analisados (tempo de refrigeração, pH, contagens do número de colónias de *Enterococcus* sp. e a qualidade sensorial). Graficamente pode-se visualizar que ao longo do tempo de refrigeração (**Fig. 14a**) a quantidade de enterotoxina detectada aumenta tendencialmente, exceptuando, o serótipo B o qual não foi detectado no 7º e no 14º dia, e o serótipo D, o qual não apresenta um aumento contínuo. Para os valores de pH analisados (**Fig. 14b**), a quantidade de enterotoxinas detectadas não aumenta de forma contínua, observando-se que o valor máximo de enterotoxina é atingido em um meio básico (8,30), excepto para o serótipo B. Tendo em conta o aumento das contagens do número de colónias de *Enterococcus* sp. foi possível verificar que a quantidade de enterotoxina estafilocócica detectada não apresentava variações notórias, excepto o serótipo B, o qual não foi detectado para valores de carga microbiana de  $1,59 \times 10^2$  e  $1,26 \times 10^4$  (CFU/g) e o serótipo D, cuja detecção foi variável em função da carga microbiana (**Fig. 14c**). Os níveis máximos de enterotoxina detectados, foram observados quando o chicharro apresenta elevada qualidade sensorial (**Fig. 14d**). A medida que o peixe vai perdendo qualidade sensorial, verificou-se uma diminuição nos níveis de enterotoxina presente, não sendo detectado o serótipo B quando o peixe apresenta-se impróprio para venda. O facto anteriormente referenciado poderá ser consequência da manipulação inadequada do peixe durante a sua comercialização.

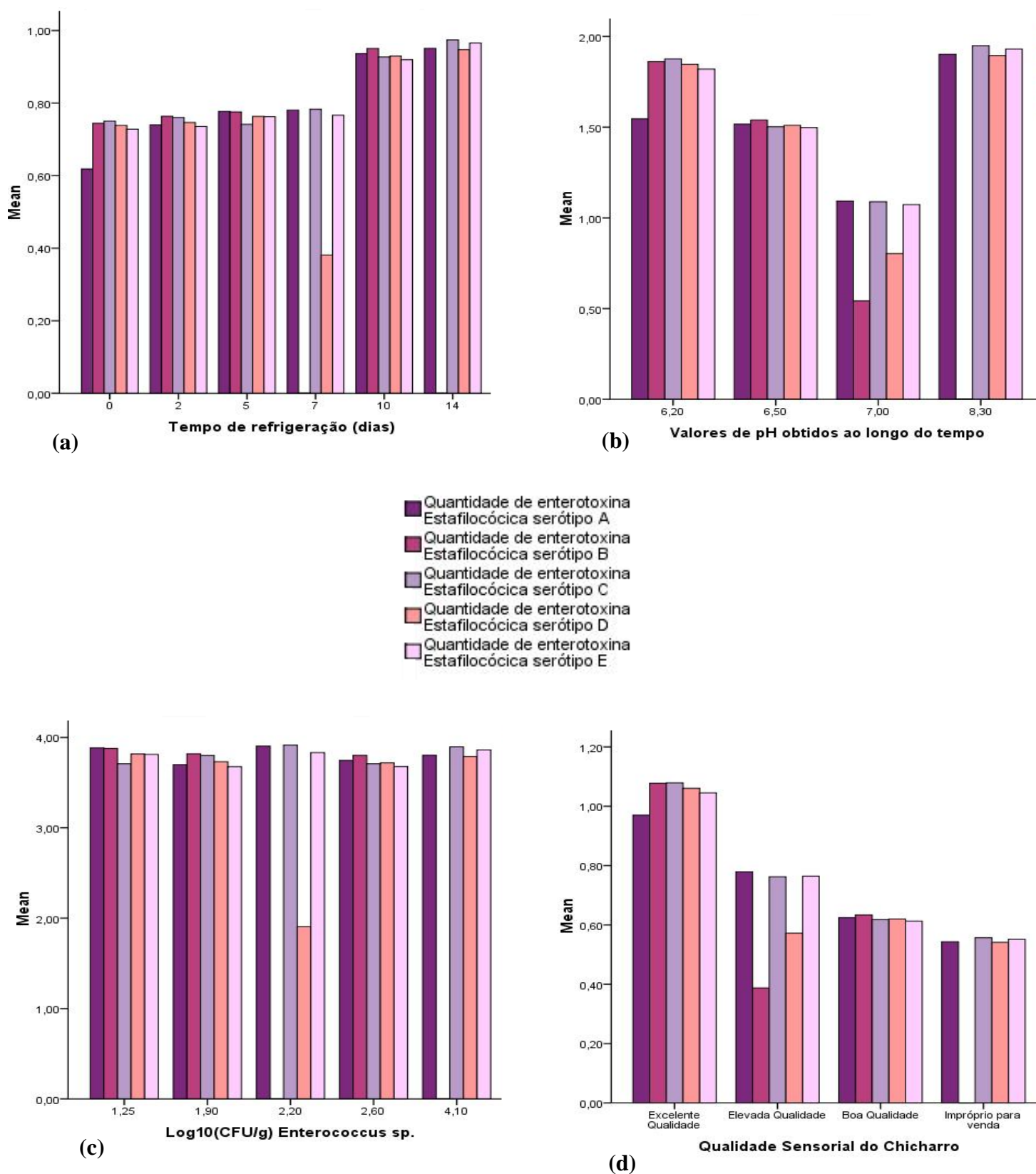
Segundo as normas, este tipo de toxina têm que estar ausente nas amostras alimentares, logo, estes resultados podem ser representativos de condições de armazenamento inadequadas, má higiene pessoal e contaminação pós processamento (Wieneke *et al.* 1993; Simon and Sanjeev 2007), indicando que a qualidade presente nas amostras não é apto para consumo. Alternativamente, baixos níveis de incidência do *Staphylococcus aureus* e/ou das suas toxinas nas unidades de processamento, são representativos, da implementação e adaptação de processos sanitários e de processamento alimentar de acordo com as boas práticas de fabricação e a análise de pontos críticos de controlo (HACCP) (Simon and Sanjeev 2007). As toxinas bacterianas constituem perigos microbiológicos dos alimentos, podendo permanecer nos alimentos processados (cozinhados), cuja ingestão provoca intoxicações alimentares, sendo um grande problema para a saúde pública (Vanne *et al.* 1996).



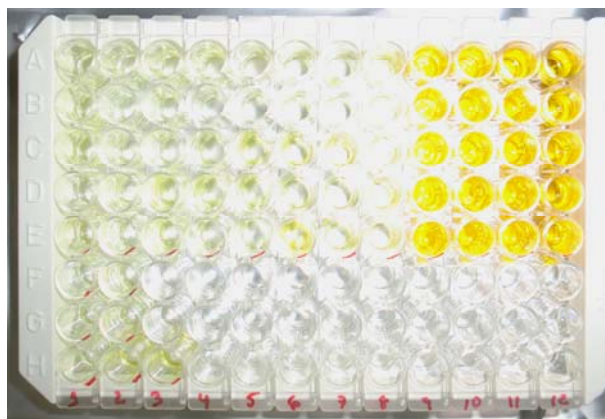


**Fig. 13** – Quantidade de enterotoxina estafilocócica A,B,C,D e E detectada na cavala em função do **(a)** Tempo de Refrigeração, **(b)** pH, **(c)** log (CFU/g) *Enterococcus* sp., e **(d)** Qualidade Sensorial.





**Fig. 14** – Quantidade de enterotoxina estafilocócica A,B,C,D e E detectada no chicharro em função do **(a)** Tempo de Refrigeração, **(b)** pH, **(c)** log (CFU/g) *Enterococcus* sp., e **(d)** Qualidade Sensorial.



**Fig. 15** – Imagem representativa do resultado positivo obtido na detecção da Enterotoxina (A, B, C, D, E) do *Staphylococcus aureus*, através do kit de detecção RIDASCREEN® SET A,B,C,D,E.

**Tabela 3** – Quantidade de Enterotoxina (A, B, C, D, E) do *Staphylococcus aureus*, obtido nas amostras de Cavala e Chicharro analisadas ao longo do tempo de refrigeração a 4 °C.

Amostras	Tempo de armazenamento a 4 °C (dias)	Toxina Staphylococcica				
		Set. A	Set. B	Set.C	Set.D	Set.E
<b>Cavala</b>						
1	0	1,36	2,002	1,746	2,635	3,409
2	2	2,169	1,383	2,103	2,86	2,046
3	5	2,22	2,9	3,331	3,117	2,095
4	7	2,55	3,006	3,463	2,835	3,236
5	10	3,113	3,599	3,506	3,546	3,183
6	14	3,267	2,883	3,834	3,764	3,699
<b>Chicharro</b>	<b>Tempo de armazenamento a 4 °C (dias)</b>	<b>Set. A</b>	<b>Set. B</b>	<b>Set.C</b>	<b>Set.D</b>	<b>Set.E</b>
1	0	3,092	3,722	3,753	3,692	3,64
2	2	3,699	3,819	3,801	3,732	3,677
3	5	3,885	3,878	3,708	3,817	3,812
4	7	3,904	0	3,915	1,906	3,833
5	10	3,747	3,802	3,708	3,718	3,678
6	14	3,803	0	3,897	3,79	3,862

## CONCLUSÃO

No presente estudo caracterizou-se microbiológica e toxicologicamente o músculo da cavala e do chicharro ao longo do tempo de armazenamento a 4 °C, a fim de determinar as mudanças de qualidade e o tempo de vida útil do pescado.

Segundo os resultados obtidos na análise sensorial, verificou-se que ambas as espécies (*Scomber colias* e *Trachurus picturatus*) perdem a qualidade ao longo do tempo de armazenamento a 4 °C, sendo a correlação entre estes dois factores (qualidade sensorial e tempo de armazenamento) estatisticamente significativa a nível do 99% ( $p < 0,01$ ). Tendo por base estes resultados, estima-se que a cavala e o chicharro tem um tempo de vida útil de 10 e 7 dias, respectivamente.

De acordo com a análise microbiológica, verificou-se que de forma generalizada para ambas as espécies analisadas, as contagens microbianas (excepto para as contagens de *Pseudomonas* spp.) tendem a aumentar ao longo do tempo de armazenamento, com um nível de significância estatística de 99% ( $p < 0,01$ ). Estes resultados permitem estimar que a 4 °C, ambas as espécies (*Scomber colias* e *Trachurus picturatus*), são aptas para consumo até 3 dias de armazenamento e ao 4º dia, apresentam padrões inaceitáveis de consumo.

No que toca a variação dos valores de pH, verificou-se que a medida que a carga microbiana aumenta no músculo do pescado, os valores de pH muscular tendem a aumentar, com um nível de significância estatística de 99% ( $p < 0,01$ ). O pH muscular, a temperatura de armazenamento, e a espécie de pescado, são factores determinantes na variação da carga microbiana que esta presente na musculatura do pescado e consequentemente da degradação do próprio alimento.

O efeito da temperatura e da espécie, no tempo de vida útil dos produtos de pescaria, foi comprovado pelo estudo de (Venugopal 2002), o qual concluiu que quando estes produtos de pescaria são congelados logo após a captura, têm um tempo de vida útil entre 7 e 15 dias. Porém se estes mesmos produtos, fossem armazenados entre 0 e 3 °C, o factor de deterioração aumentava para o dobro. Finalmente, quando armazenados a 10 °C, a deterioração pode aumentar por um factor de 5-6 vezes, reduzindo significativamente o tempo de vida útil da matéria prima.

Relativamente as toxinas, verificou-se através do ensaio imunoenzimático ELISA a presença da verotoxina 1 e 2 numa amostra de cavala com 15 dias de armazenamento e com uma qualidade imprópria para venda. Não se verificou correlações estatisticamente significativa entre a presença da verotoxina 1 e 2 e as contagens do número de colónias de bactérias entéricas, o pH muscular, e a qualidade sensorial ao longo do tempo de armazenamento.

No que toca a análise da enterotoxina estafilocócica, detectou-se a presença da mesma nas amostras analisadas. Na cavala verificou-se correlações estatisticamente significativas ao nível do 99% ( $p < 0,01$ ) entre os serótipos A, C e D, e as contagens microbianas, o pH muscular e a qualidade sensorial ao longo do tempo de armazenamento. No chicharro, verificou-se a presença da enterotoxina estafilocócica, mas não foi possível verificar correlação estatisticamente significativa entre a presença da enterotoxina e os factores analisados.

Tendo em conta os resultados toxicológicos anteriormente indicados, conclui-se que a presença das toxinas, são indicativas de falhas ao nível das medidas higiosanitárias dos manipuladores, dos locais de comercialização, dos instrumentos utilizados ou até das condições de armazenamento, fazendo com que os produtos percam qualidade, reduzindo o seu tempo de vida útil apto para consumo.

## ANEXOS

**Tabela 1** – Normas da Organização Mundial para Saúde para a qualidade microbiológica de vários alimentos prontos a comer.

Food category (see Table 2.2)	Criterion	Microbiological quality (cfu/g unless stated)			Unacceptable/ potentially hazardous
		Satisfactory	Acceptable	Unsatisfactory	
	<b>Aerobic colony count* 30°C/4 h</b>				
1		<10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup> –<10 <sup>4</sup>	≥10 <sup>4</sup>	N/A†**
2		<10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup> –<10 <sup>5</sup>	≥10 <sup>5</sup>	N/A**
3		<10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup> –<10 <sup>6</sup>	≥10 <sup>6</sup>	N/A**
4		<10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup> –<10 <sup>7</sup>	≥10 <sup>7</sup>	N/A**
5		N/A	N/A	N/A	N/A**
	<b>Indicator organisms††</b>				
1–5	Enterobacteriaceae‡	<100	100–<10 <sup>4</sup>	≥10 <sup>4</sup>	N/A**
1–5	<i>Escherichia coli</i> (total)	<20	20–<100	≥100	N/A**
1–5	<i>Listeria</i> spp. (total)	<20	20–<100	≥100	N/A**
	<b>Pathogens</b>				
1–5	<i>Salmonella</i> spp.	ND			D
1–5	<i>Campylobacter</i> spp.	ND			D
1–5	<i>E.coli</i> O157 & other VTEC	ND			D
1–5	<i>Vibrio cholerae</i>	ND			D
1–5	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> <sup>§</sup>	<20	20–<100	100–<10 <sup>3</sup>	≥10 <sup>3</sup>
1–5	<i>Listeria monocytogenes</i>	<20¶	20–<100	N/A	≥100
1–5	<i>Staphylococcus aureus</i>	<20	20–<100	100–<10 <sup>4</sup>	≥10 <sup>4</sup>
1–5	<i>Clostridium perfringens</i>	<20	20–<100	100–<10 <sup>4</sup>	≥10 <sup>4</sup>
1–5	<i>Bacillus cereus</i> and other pathogenic <i>Bacillus</i> spp. <sup>  </sup>	<10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup> –<10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup> –<10 <sup>5</sup>	≥10 <sup>5</sup>

cfu, colony forming units; VTEC, verocytotoxin producing *E. coli*. D, detected in 25 g; ND, not detected in 25 g.

\*Guidelines for aerobic colony counts may not apply to certain fermented foods, e.g. salami, soft cheese and unpasteurized yoghurt. These foods fall into Category 5. Acceptability is based on appearance, smell, texture and the levels or absence of indicator organisms or pathogens.

†N/A denotes not applicable.

‡Not applicable to fresh fruit, vegetables and salad vegetables.

§Relevant to seafoods only.

¶If the *Bacillus* counts exceed 10<sup>4</sup> cfu/g, the organism should be identified.

¶¶Not detected in 25 g for certain long shelf-life products under refrigeration.

\*\*Prosecution based solely on high colony counts and/or indicator organisms in the absence of other criteria of unacceptability is unlikely to be successful.

††On occasions some strains may be pathogenic.

**Tabela 2** – Categorias dos tipos de alimentos marinhos prontos a comer.

Seafood	Crustaceans (crab, lobster, prawns)	3
	Herring/roll mop and other raw pickled fish	1
	Other fish (cooked)	3
	Seafood meals	3
	Molluscs and other shellfish (cooked)	4
	Smoked fish	4
	Taramasalata	4

**Tabela 4 – Testes bioquímicos presentes na galeria de identificação API 20E**



**TABLA DE LECTURA**

TESTS	SUBSTRATOS	REACCIONES/ENZIMAS	RESULTADOS	
			NEGATIVO	POSITIVO
ONPG	ortonitrofenol-galactosido	$\beta$ -galactosidasa	incoloro	amarillo (1)
ADH	arginina	arginina dehidrolasa	amarillo	rojo/ naranja (2)
LDC	lisina	lisina descarboxilasa	amarillo	naranja
ODC	ornitina	ornitina descarboxilasa	amarillo	rojo/ naranja (2)
[ CIT ]	citrato sódico	utilización del citrato	verde pálido/ amarillo	azul-verde / azul (3)
H <sub>2</sub> S	tiosulfato sódico	producción de H <sub>2</sub> S	Incoloro/ grisáceo	depósito negro
URE	urea	ureasa	amarillo	rojo/ naranja
TDA	triptófano	triptófano desaminasa	TDA / INMEDIATO	
			amarillo	marrón oscuro
IND	triptofano	producción del indol	JAMES / INMEDIATO o IND / 2	
			JAMES incoloro verde claro/ amarillo IND amarillo	JAMES rosa IND anillo rojo
[ VP ]	piruvato sódico	producción de acetoina	VP 1 más VP 2 / 10 minutos	
			incoloro	rosado/ rojo
[ GEL ]	gelatina de Kohn	gelatinasa	no hay difusión de pigmento negro	difusión de pigmento negro
GLU	glucosa	fermentación/ oxidación (4)	azul/ azul verdoso	amarillo
MAN	manitol	fermentación/ oxidación (4)	azul/ azul verdoso	amarillo
INO	inosito	fermentación/ oxidación (4)	azul/ azul verdoso	amarillo
SOR	sorbitol	fermentación/ oxidación (4)	azul/ azul verdoso	amarillo
RHA	ramnosa	fermentación/ oxidación (4)	azul/ azul verdoso	amarillo
SAC	sacarosa	fermentación/ oxidación (4)	azul/ azul verdoso	amarillo
MEL	melibiosa	fermentación/ oxidación (4)	azul/ azul verdoso	amarillo
AMY	amigdalina	fermentación/ oxidación (4)	azul/ azul verdoso	amarillo
ARA	arabinosa	fermentación/ oxidación (4)	azul/ azul verdoso	amarillo
OX	sobre papel de filtro	citocromo oxidasa	OX / 1-2 minutos	
			incoloro	violeta
NO <sub>3</sub> NO <sub>2</sub>	tubo GLU	producción de NO <sub>2</sub>  reducción a gas N <sub>2</sub>	NIT 1 más NIT 2 / 2-3 minutos	
			amarillo	rojo
			Zn	
			rojo	amarillo
MOB	API M o microscopia	movilidad	inmovil	movil
MCC	medio Mac Conkey	crecimiento	ausencia	presencia
OF	glucosa (API OF)	cerrado: fermentación abierto: oxidación	verde verde	amarillo amarillo

1) Un amarillo muy pálido debe considerarse como positivo

2) Un color naranja después de 24 H. de incubación debe considerarse negativo

3) La lectura debe hacerse en la cupula (aerobiosis)

4) La fermentación empieza en la parte inferior de los tubos, la oxidación empieza en la cupula.

## BIBLIOGRAFIA

1. (EFSA), E.F.S.A. (2007) Monitoring of verotoxin *Escherichia coli* (VTEC) and identification of human pathogenic VTEC types: scientific opinion of the panel on biological hazards. *EFSA Journal* **597**, 1 - 61.
2. (ICMSF), I.C.o.M.S.f.F. (1998) Microorganism in Foods, 6: Microbial Ecology of Food Commodities.: Blackie Academic & Professional.
3. Aceson, D. (1999) Toxins associated with foodborne illness. *J Food Quality* **6**, 30, 44, 54.
4. Administration, F.a.D. (1992) *Bacteriological Analytical Manual*. Arlington VA: J. Assoc. Offic. Anal. Chem.
5. Al Bulushi, I.M., Poole, S.E., Barlow, R., Deeth, H.C. and Dykes, G.A. (2010) Speciation of Gram-positive bacteria in fresh and ambient-stored sub-tropical marine fish. *Int J Food Microbiol* **138**, 32 – 38.
6. Ashie, I.N.A., Simson, B.K. and Smith, J.P. (1996) Spoilage and shelf life extension of fresh fish and shelfish. *Crit Rev Food Sci Nutr* **36**, 87 - 121.
7. Baker, D.A. (1995) Application of modelling in HACCP plan development. *Int J Food Microbiol* **25**, 251 – 261
8. Barbosa, A., Bremner, A. and Van-Pires, P. (2002) The meaning of shelf-life. In *Safety and quality issues in fish processing* ed. (Ed.), A.H.B. pp.173 - 190. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited.
9. Bauchot, M.L. and Pras, A. (1980) Guide des poissons marins d' Europe ed. Editeurs, D.a.N. p.269.
10. Behling, A.R. and Taylor, S.L. (1982) Bacterial histamine production as a funtion of temperature and time of incubation. *J Food Sci* **47**, 1311 - 1317.
11. Benguria, R.L. and Camiña, M.H. (1975) Peces de Mar y de Rio ed. Urmo, S.A.d.E.E. Bilbao, Espanha.
12. Bhunia, A.K. (2006) *Detection of significant bacterial pathogens and toxins of interest in homeland security. In The Science of Homeland Security*. West Lafayette: Purdue University Press.
13. Braun, P. and Sutherland, J.P. (2003) Predictive modelling of growth and enzyme production and activity by a cocktail of *Pseudomonas* spp., *Shewanella putrefaciens* and *Acinetobacter* sp. *Int J Food Microbiol* **86**, 271 – 282.
14. Bryan, F.L. (1980) Food borne diseases in United States associated with meat and poultry. *J Food Prot* **43**, 140 - 150.
15. Campbell-Platt, G. (1994) Food Control - the future. *J Food Control* **5**, 2.
16. Carmo, L.S., Dias, R.S. and Linardi, V.R. (2002) Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas Cheese and raw milk in Brazil. *J Food Microbiol* **19**, 9 - 14.



17. Chytiri, S., Chouliara, I., Savvaidis, I.N. and Kontominas, M.G. (2004) Microbiological, chemical and sensory assessment of iced whole and filleted aquacultured rainbow trout. *J Food Microbiol* **21**, 157-165
18. Colakoglu, F.A., Sarmasik, A. and Koseoglu, B. (2006) Occurrence of *Vibrio* spp. and *Aeromonas* spp. in shellfish harvested off Dardanelles coast of Turkey. *J Food Control* **17**, 648-652.
19. Collette, B.B. (1999) Mackerels, molecules, and morphology. In *B Séret and J-Y Sire (eds) Proc 5th Indo-Pac.* pp.149-164. Noumea, Paris: Fish Conf.
20. Collette, B.B. and Nauen, C.E. (1983) FAO species catalogue. *Scombrids* of the world. An annotated and illustrated catalogues of tunas, mackerels, bonitos and related species known to date. FAO. *J Fish Synopsis* **2**, 137.
21. Commission., E. (1993) Council Directive 93/43/EEC on the hygiene of foodstuffs. *Off J Eur Communities* **175**, 1–11.
22. Connell, J.J. (1975) Control of Fish Quality. London: Fishing News Books Limited.
23. Connell, J.J. (1995) Control of fish quality. In *Fishing News Books: Blackwell Science, Oxford.*
24. Davis, H.K. (1995) Quality and deterioration of raw fish. In *A Ruiter (Ed), Fish and Fishery products.* p.218. Wallingford: UK: Cab. International.
25. Deibel, R.H. and Silliker, J.H. (1963) Food poisoning potential of *Enterococci*. *J Bacteriol* **85**, 827 – 832.
26. Domig, K.J., Mayer, H.K. and Keneifel, W. (2003) Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp. 1. Media for isolation and enumeration. *Int J Food Microbiol* **88**, 147 – 164.
27. Dondero, M., Citeras, F., Carvajal, L. and Simpson, R. (2004) Changes in quality of vacuum-packed cold-smokes salmon (*Salmo solar*) as a function of storage temperature. *Food Chem* **87**, 543 - 550.
28. Donnenberg, M.S. and Whittan, T.S. (2001) Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Clin Inv* **107**, 539.
29. Doyle, M.P. (1991) *Escherichia coli* 0157:H7 and its significance in foods. *Int J Food Microbiol* **12**, 289.
30. Doyle, M.P. and Padhye, V.V. (1989) *Escherichia coli*. In *Foodborne Bacterial Pathogens.* p.235. New York.
31. Edwards, R.A., Dainty, R.H. and Hibbard, C.M. (1987) Volatile compounds produced by meat pseudomonads and related reference strain during growth on beef stored in air at chill temperatures. *J Appl Bacteriol* **62**, 403 – 412.
32. Ehira, S. and Uchiyama, H. (1986) Determination of fish freshness using the K value and comments on some other biochemical changes in relation to freshness. pp.185 - 207. Amsterdam: Seafood Quality Determination. Elsevier Sci.
33. Erickson, M.C. and Doyle, M.P. (2007) Food as a vehicle for transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Food Prot* **70**, 2426 - 2449.

34. Esaiassen, M., Nilsen, H., Joensen, S., Skjerdal, T., Carlehög, M. and Eilertsen, G. (2004) Effects of catching methods on quality changes during storage of cod (*Gadus morhua*). *J LWT - Food Sci and Technol* **37**, 643 - 648.
35. Evenson, M.L., Hinds, M.W., Bernstein, R.S. and Bergdoll, M.S. (1998) Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *Int J Food Microbiol* **7**, 311 - 316.
36. FAO (2002) Postmortem changes in fish. In *Quality and quality changes in fresh fish*: Available from <http://www.fao.org/docrep/v7180e/v7180e06.htm>.
37. Ferreira Canas, W.F., F. de Sousa, J.C. and Lima, N. (2010) Microbiologia. pp.166-195: Edit. Lidel.
38. Foulquié Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E. and De Vuyst, L. (2006) The role and application of *Enterococci* in food and health. *Int J Food Microbiol* **106**, 1-24.
39. Fraizer, W.C. and Westhoff, D.C. (1988) Contamination, preservation and spoilage of fish and other seafoods. In *Food Microbiol.* . pp.243 - 254. Singapore: Kin Koeng Co. Pte. Ltd.
40. Frank, H.A. (1985) VI.1. Use of normographs to estimate histamine formation in tuna. In *Histamine Formation in Marine Products: Production by Bacteria, Measurement and Prediction of Formation*, FAO Fisheries Technical Paper Nº 252. pp.18 - 20. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
41. Franz, E. and van Bruggen, A.H.C. (2008) Ecology of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in the primary vegetable production chain. *Cri Rev Microbiol* **34**, 143 - 161.
42. Gamage, S.D., Strasser, J.E., Chalk, C.L. and Weiss, A.A. (2003) Nonpathogenic *Escherichia coli* Can Contribute to the Production of Shiga Toxin. *J Infec* **71**, 3107 - 3115.
43. Garcia-Armesto, M.R., Prieto, M., Alondo, C., Garcia-Lopez, M.L., Garcia Fernandez, M.C. and Otero, A. (1993) Numerical Taxonomy of Psychrotrophic bacteria isolated from raw ewes milk. *J Dairy Res* **60**, 371 - 383.
44. Gilbert, R.J., de Louvois, J., Donovan, T., Little, C., Ribeiro, C.D., Richards, J., Roberts, D. and Bolton, F.J. (2000) Guidelines for the microbiological quality of some ready – to – eat foods sampled at the point for sale. *Communicable Disease and Public Health* **3**, 163 – 167.
45. Gill, T.A. (1990) Objective analysis of seafood quality. *Food Rev Int* **6**, 681 - 714.
46. Gill, T.A. (1992) Chemical and biochemical indices in seafood quality. . pp.479 - 490. Amsterdam: Quality Assurance in the Fish Industry. Elsevier Sci. Publishers.
47. Gill, T.A. (1997) Advanced analytical tools in seafood science. pp.479 - 490. Amsterdam: Quality Assurance in the Fish Industry. Elsevier Sci. Publishers.
48. Gillespie, N.C. (1981) A numeral taxonomic study of *Pseudomonas* like bacteria isolated from fish in Southcentral Queensland and their association with spoilage. *J Appl Bacteriol* **50**, 29 - 44.
49. Giraffa, G. (2002) *Enterococci* from foods. *J FEMS Microbiol Rev* **26**, 163 - 171.
50. Gram, L. (1993) Inhibitory effect against pathogenic and spoilage bacteria as *Pseudomonas* strains isolated from spoiled and fresh fish. *J Appl Environ Microbiol* **59**, 2197 - 2203.



51. Gram, L. (1994) Siderophore-mediated iron sequestering by *Shewanella putrefaciens*. *J Appl Environ Microbiol* **60**, 2132 - 2136.
52. Gram, L. and Huss, H.H. (1996) Microbiological spoilage of fish and fish products. *Int J Food Microbiol* **33**, 121-137.
53. Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J.B., Christensen, A.B. and Givskov, M. (2002) Food Spoilage - Interactions between food spoilage bacteria. *Int J Food Microbiol* **78**, 79-97.
54. Hackney, C.R., Ray, B. and Speck, M.L. (1979a) Repair Detection Procedure for Enumeration of Fecal Coliforms and *Enterococci* from Seafoods and Marine Environments. *J Appl Environ Microbiol*, 947 - 953.
55. Hackney, C.R., Ray, R. and Speck, M. (1979b) Repair detection procedure for enumeration of fecal coliforms and *Enterococci* from seafoods and marine environments. *J Appl Environ Microbiol* **37**, 947.
56. Hartman, P.A., Deibel, R.H. and Sieverding, L.M. (1992) *Enterococci*. In *In Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* eds. Vanderzant, C. and Splittstoesser, D.E., Eds. p.523. Washington DC: American Public Health Association.
57. Hayes, P.R. (1985) Food microbiology and hygiene. pp.99 - 105. London and New York: Elsevier App. Sci. Publishers.
58. Huang, S.L., Weng, Y.N. and Chiou, R.Y. (2001) Survival of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* as affected by ethanol and NaCl. *J Food Prot* **64**, 546 - 550.
59. Hubbs, J. (1991) Fish: microbiological spoilage and safety. *Food Sci Thechnol Today* **5**, 166 173.
60. Huis in't Veld, J.H.J. (1996) Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *Int J Food Microbiol* **33**, 1 - 18.
61. Jablonski, L.M. and Bohach, G.A. (2001) *Staphylococcus aureus*. In M.P. Doyle, L. Beuchat, & T. Montville (Eds.). pp.411 - 433. Washington DC: ASM Press.
62. Jackson, T.C., Acuff, G.R. and Dickson, J.S. (1997) Meat, poultry and seafood. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, & T. J. Montville (Eds.). In *Food microbiology fundamentals and frontiers*. Washington DC: ASM Press.
63. Janssen, M.M.T., Put, H.M.C. and Nout, M.J.R. (1997) Natural toxins. In J. de Vries (Ed.). pp.7 - 37: Boca Raton, Fla.: CRC Press.
64. Jay, J.M. (1992) Microbiological Indicators of food safety and quality, Principles and Quality control, and microbiological criteria. In *Modern Food Microbiology* New York: Van Nostrand Reinhold.
65. Jouve, J.L. (1994) HACCP as applied in the EEC. *J Food Control* **5**, 181 - 186.
66. Karmali, M.A., Steele, B.T., Petric, M. and Lim, C. (1983) Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with fecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *J Lancet* **vol. i**, 619 - 620.
67. Kornacki, J.L. and Marth, E.L. (1982) Foodborne illness caused by *Escherichia coli*. review, *J Food Prot* **45**, 1051.

68. Koutsoumanis, K., Giannakourou, M.C., Taoukis, P.S. and Nychas, G.J.E. (2002) Application of shelf life decision system (SLDS) to marine cultured fish quality. *Int J Food Microbiol* **73**, 375 – 382.
69. Koutsoumanis, K., Lambropoulou, K. and Nychas, G.-J.E. (1999) Biogenic amines and sensory changes associated with the microbial flora of Mediterranean gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) stored aerobically at 0, 8 and 15 °C. *J Food Prot* **62**, 398 - 402.
70. Koutsoumanis, K. and Nychas, G.J.E. (1999) Chemical and Sensory Changes associated with microbial flora of bogue (*Boops boops*) stored aerobically at 0, 3, 7 and 10 °C. *J Appl Environ Microbiol* **65**, 698 – 706.
71. Lehane, L. and Olley, J. (2000) Rev. Histamine fish poisoning revisited. *Int J Food Microbiol* **58**, 1 - 37.
72. Lima dos Santos, C.A.M. (1981) The storage of tropical fish in ice – a review. *Trop Sci* **23**, 97 – 127.
73. Lindberg, A.M., Ljungh, A., Ahrne, S., Löfdahl, S. and Molin, G. (1998a) *Enterobacteriaceae* found in high numbers in fish, minced meat and pasteurised milk or cream and presence of toxin encoding gene. *Int J Food Microbiol* **39**, 11 - 17.
74. Lindberg, A.M., Ljungh, A., Ahrné, S., Löfdahl, S. and Molin, G. (1998b) *Enterobacteriaceae* found in high numbers in fish, minced meat and pasteurised milk or cream and the presence of toxin encoding genes. *Int J Food Microbiol* **39**, 11 - 17.
75. Liyhs, U., Lahtinen, J. and Schelvis - Smit, R. (2007) Microbiological quality of maatjes herring stored in air and under modified atmosphere at 4 and 10 °C. *J Food Microbiol* **24**, 508 - 516.
76. Losada, V., Piñero, C., Barros-Velázquez, J. and Aubourg, S.P. (2005) Inhibition of chemical changes related to freshness loss during storage of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) in slurry ice. *J Food Chem* **93**, 619 - 625.
77. Love, R.M. (1980) The chemical biology of fishes. *Academic Press, London* vol. II.
78. Marin, M.E., Rosa, M.C.L. and Cornejo, I. (1992) Enterotoxigenicity of *Staphylococcus* strains isolated from Spanish dry-cured hams. Applied and Environmental Microbiology. *J Food Control* **58**, 1067 - 1069.
79. Martinsdóttir, E. (2002) Quality management of stored fish. In *Safety and quality issues in fish processing* ed. (Ed.), A.H.B. pp.173 - 190. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited.
80. Matches, J.R. and Abeyta, C. (1983) Indicator organisms in fish and shellfish. *J Food Technol* **37**, 114.
81. Miller III, A., Scanlan, R.A., Lee, J.S. and Libbey, L.M. (1973) Identification of volatile compounds produced in sterile fish muscle (*Sebastes melanops*) by *Pseudomonas putrefaciens*, *Pseudomonas fluorescens* and *Achromobacter* species. *J Appl Microbiol* **26**, 18 - 21.
82. Mitchell, R.T. (2000) Practical Microbiological Risk Analysis. ed. (Oxford), C.P.L. p.105.
83. Molin, G. and Stenström, I.M. (1984) Effect of temperature on the microbial flora of herring fillets in air or carbon dioxide. *J Appl Bacteriol* **56**, 275 - 282.

84. Mossel, D.A.A., Corry Janet, E.L., Struijk Corry, B. and Baird Rosamund, M. (1995) Essentials of the Microbiology of Foods: A Textbook of Advanced Studies. In London, John Wiley & Sons.
85. Mundt, O.J. (1986) *Enterococci*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* ed. Williams and Wilkins, B. pp.1063 – 1065.
86. Nakano, S., Kobayashi, T., Funabiki, K., Matsumura, A., Nagao, Y. and Yamada, T. (2004) PCR detection of *Bacillus* and *Staphylococcus* in various foods. *J Food Prot* **67**, 1271 - 1277.
87. Nataro, J.P. and Kaper, J.B. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol Rev* **11**, 142.
88. Ng, D.L.K. and Tay, L. (1993) Enterotoxigenic strains of coagulase positive *Staphylococcus aureus* in drinks and ready to eat foods. *J Food Microbiol* **10**, 317 - 320.
89. Noble, R.T., Moore, D.F., Leecaster, M.K., McGee, C.D. and Weisberg, S.B. (2003) Comparison of total coliform, fecal coliform, and *Enterococcus* bacterial indicator response for ocean recreational water quality testing. *J Water Research* **37**, 1637-1643.
90. Paludan-Müller, C., Dalgaard, P., Huss, H.H. and Gram, L. (1998) Evaluation of the role of *Carnobacterium piscicola* in spoilage of vacuum and modified-atmosphere-packed cold-smokes salmon at 5 °C. *Int J Food Microbiol* **39**, 155 - 166.
91. Pelczar, J.R.M.J., Chan, E.C.S. and Krieg, N.R. (1997) Microbiologia: Conceito e aplicações. pp.371-397. São Paulo: McGraw-Hill.
92. Pereira, M.L., de Carmo, L.S., dos Santos, E.J. and Bergdoll, M.S. (1994) Staphylococcal food poisoning from cream-filled cake in metropolitan area of South-Eastern Brazil. *Revista de Saúde Pública* **28**, 406 - 409.
93. Ray, B. and Bhunia, A. (2008) Fundamental Food Microbiology. pp.30-31, 37-38, 53, 57-58, 60-61, 212-213, 225-226, 269-271, 294-298, 315-316, 352-354, 441, 444-445, 471-474: CRC Press, Taylor & Frands Group Tayler
94. Reineccius, G. (1990) Off-flavours in foods. *J Crit Rev Food Sci Nutr* **29**, 381 - 402.
95. Ribeiro, A.M.R. (1974) Padrões bacteriológicos de alimentos portugueses. *J Rev Microbiol* **5**, 1.
96. Richardson, G.H. (1985) Standard Methods for the Examination of Dairy Products. Washington DC: American Public Health Association.
97. Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., McGee, H.B., Wells, J.G., Davis, B.R., Hebert, R.J., Olcott, E.S., Johnson, L.M., Hargrett, N.T., Blake, P.A. and Cohen, M.L. (1983) Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* **308**, 681 - 685.
98. Rivas, L., McDonnell, M.J., Burges, C.M., O'Brien, M., Navarro-Villa, A., Fanning, S. and Duffy, G. (2010) Inhibition of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in model broth and rumen systems by carvacrol and thymol. *Int J Food Microbiol* **139**, 70 - 78.
99. Roberts, D. and Greenwood, M. (2003) Practical Food Microbiology. pp.15-18, 55-56, 157-158, 160, 166-167: Blackwell Publishing.

100. Rodríguez, Ó., Losada, V., Aubourg, S.P. and Barros-Velázquez, J. (2005) Sensory, microbial and chemical effects of a slurry ice system on horse mackerel (*Trachurus trachurus*). *J Sci Food and Agr* **85**, 235 - 242.
101. Sanjeev, S., Iyer, K.M., Rao, C.C.P. and James, A.M. (1986) Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococci* in frozen fishery products. *J Fishery Technol* **23**, 164 - 166.
102. Sapin-Jaloustre, H. and Sapin-Jaloustre, J. (1957) A little-Know food poisoning: histamine poisoning from tuna. pp.2705 - 2708. Paris: Concours Med.
103. Schleifer, K.H. and Kilpper-Balz, R. (1987) Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of *Streptococci*, *Enterococci* and *Lactococci*. a review *J Syst Appl Microbiol* **10**, 1.
104. SERVICES., N. Interpreting Microbiological Results of Food, Guidance for Local Food Businesses.
105. Sherman, J.M. (1937) The *Streptococci*. *J Bacteriol Rev* **1**, 3 - 97.
106. Shewan, J.M. (1977) The bacteriology of fresh and spoiling fish and the biochemical changes induced by bacterial action. In Proceedings of the conference on handling, processing and marketing of tropical fish. p.51. London: Tropical Products Inst.
107. Silliker, J.H., Elliot, R.P., Baird-Parker, A.C., Bryan, F.L., Christian, J.H. and Clark, D.S. (1980) International commission on microbiological specifications for foods. Microbiological ecology of foods. In *Food commodities*. pp.567 - 605. London: Academic Press Inc. Ltd.
108. Simeonidou, S., Govaris, A. and Vareltzis, K. (1998) Quality assessment of seven Mediterranean fish species during storage in ice. *J Food Research Int* **30**, 479 - 484.
109. Simon, S.S. and Sanjeev, S. (2007) Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in fishery products and fish processing factory workers. *J Food Control* **18**, 1565 - 1568.
110. Skjervold, P.O., Fjaera, S.O., Ostby, P.B. and Einen, O. (2001) Livechilling and crowding stress before slaughter of Atlantic salmon (*Salmo solar*). *J Aquaculture* **192**, 265 - 280.
111. Smith-Vaniz, W.F. (1986) *Carangidae*. Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean. pp.517-1007. Paris: Unesco.
112. Smith-Vaniz, W.F. and Berry, F.H. (1981) *Carangidae*. FAO species identification sheets for fishery purpose - Fishing areas (Eastern Central Atlantic). pp.34, 47. Canada.
113. Sousa, C.M., Bragança, M.G. and Coli, M.C.M. (1998) Manual de boas práticas de fabricação de pão de queijo. *Belo Horizonte: CETEC*, 54.
114. Spencer, R. and Georgala, D.L. (1957) Bacteria of public health significance on white fish prior to brining. Proc. 2nd Intern. pp.299 - 301. HMSO, London.: Symp. Found. Microbiol.
115. Stiles, M.E. and Holzapfel, W.H. (1997) Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol* **36**, 1-29.

116. Strachan, N.J.C., Dunn, G.M., Locking, M.E., Reid, T.M.S. and Ogden, I.D. (2006) *Escherichia coli* O157: burger bug or environmental pathogen? *Int J Food Microbiol* **112**, 129 - 137.
117. Synder, O.P. and Poland, D.M. (1991) America's safe food part. 2. *J Dairy Food Envt Sanit* **11**, 4 - 20.
118. Taylor, S.L. and Summer, S.S. (1986) Determination of histamine, putrescine and cadaverine. In *Kramer, DE, Liston, J (Eds)*. pp.235 - 245. Amsterdam: Seafood Quality Determination, Elsevier.
119. Ternström, A. and Lindberg, A.M. (1987) Incidence of potential pathogens on raw pork, beef and chicken in Sweden, with special reference to *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *J Food Protect* **50**, 141 - 146.
120. Truelstrup Hansen, L., Drewes Rontved, S. and Huss, H.H. (1998) Microbiological quality and shelf-life of cold-smoked salmon from three different processing plants. *J Food Microbiol* **15**, 137 - 150.
121. Truelstrup Hansen, L., Gill, T.A., Drewes Rontved, S. and Huss, H.H. (1996) Importance of autolysis and microbiological activity on quality of cold-smoked salmon. *J Food Res Int* **29**, 181 - 188.
122. Tzikas, Z., Ambrosiadis, I., Soutos, N. and Georgakis, S. (2007a) Quality assessment of Mediterranean horse mackerel (*Trachurus mediterraneus*) and blue jack mackerel (*Trachurus picturatus*) during storage in ice. *J Food Control* **18**, 1172 - 1179.
123. Tzikas, Z., Amvrosiadis, I., Solutos, N. and Georgakis, S. (2007b) Seasonal variation in the chemical composition and microbiological conditions of Mediterranean horse mackerel (*Trachurus mediterraneus*) muscle from the North Aegean Sea (Greece). *J Food Control* **18**, 251 - 257.
124. Vanderzant, C. and Splittstoesser, D.E., Ed. (1992) Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Washington, DC: American Public Health Association.
125. Vanne, L., Karwoski, M., Karppinen, S. and Sjöberg, A.M. (1996) HACCP - based food quality control and rapid detection methods for microorganism. *RevJ Food Control* **7**, 263 - 276.
126. Varman, A.H. and Evans, M.G. (1996) Foodborne pathogens. *An illustrated text Marison publishing*, 501.
127. Venugopal, V. (1990) Extracellular proteases of contaminant bacteria in fish spoilage. *J Food Prot* **53**, 341 - 350.
128. Venugopal, V. (2002) Review Biosensors in fish production and quality control. *J Biosens Bioelec* **17**, 147 - 157.
129. Ward, D.R. and Baj, N.J. (1988) Factors affecting microbiological quality of seafoods. *J Food technol* **42**, 85 - 89.
130. Wieneke, A.A., Roberts, D. and Gilbert, R.J. (1993) Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969 - 90. *J Epidemiol Inf* **110**, 519 - 531.

131. Willey, J.M., Sherwood, L.M. and Woolverton, C.J. (2008) *Prescott, Harley and Klein's Microbiology*. Mc. Graw Hill, Higher Education.
132. Zell, C., Resch, M., Rosenstein, R., Albrecht, T., Hertel, C. and Götz, F. (2008) Characterization of toxin production of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from the food and starter cultures. *Int J Food Microbiol* **127**, 246 - 251.